



Wrocław, 21.11.2023

**Prof. dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka**

Zespół Biologicznej Chemii Nieorganicznej

e-mail: [elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl](mailto:elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl)**RECENZJA****rozprawy doktorskiej mgr Nicole Nowak****pt. „Otrzymywanie oraz badanie kompozytów na bazie nanokrystalicznych apatytów domieszkowanych biologicznie aktywnymi jonami przeznaczonych do wypełnień ubytków tkankowych oraz regeneracji tkanek”****wykonanej w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała J. Wiglusza**

Biomineralizacja to proces prowadzący do powstania struktury hierarchicznej organiczno-nieorganicznych materiałów wytwarzanych przez organizmy żywe, takich jak kości czy zęby. W ciągu ostatnich kilku dekad obserwujemy poszerzenie wiedzy dotyczącej makrocząsteczek zaangażowanych w procesy biomineralizacji i interakcji między nimi. Co więcej, odkryto naturalne mechanizmy wytwarzania biominerałów, a ogromne wysiłki skierowano także na odtworzenie kluczowych strategii wytwarzania i cech konstrukcyjnych w projektowaniu syntetycznych materiałów zastępczych i regeneracyjnych. Zainteresowanie polem badań takich materiałów wzrosło dodatkowo, gdy pokazano, że domieszkowanie matryc pierwiastkami czy związkami aktywnymi biologicznie poprawia nie tylko ich właściwości fizyko-chemiczne czy mechaniczne, ale też biochemiczne, jak np. kościotwórcze i może przyspieszać procesy leczenia. W tym nurcie badawczym mieści się również rozprawa doktorska mgr Nicole Nowak, wykonana w grupie Profesora Rafała J. Wiglusza, w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. Profesor Wiglusz od wielu lat projektuje i bada różnorodne materiały domieszkowane jonami lantanowców i innych pierwiastków w kontekście ich zastosowania w różnych dziedzinach inżynierii materiałowej. Pani mgr Nicole Nowak w ramach rozprawy podjęła się zaprojektowania, syntezy oraz określenia właściwości fizyko-chemicznych i zachowania w odniesieniu do komórek biologicznych serii kompozytów nanokrystalicznych apatytów domieszkowanych wybranymi jonami metali do potencjalnych zastosowań jako materiały do wypełnień ubytków tkankowych oraz regeneracji tkanek. Tematyka dysertacji jest zatem bardzo aktualna i wypełnia zapotrzebowanie na poszerzenie wiedzy w przedmiotowej dziedzinie.

Rozprawa doktorska mgr Nicole Nowak powstała w oparciu o cykl trzech publikacji naukowych:

1. Nowak, N.; Wiglusz, R.J. A Study of Vanadate Group Substitution into Nanosized Hydroxyapatite Doped with Eu<sup>3+</sup> Ions as a Potential Tissue Replacement Material. *Nanomaterials* 2022, 12, 77.
2. Charczuk, N.; Nowak, N.; Wiglusz, R.J. Synthesis and Investigation of Physicochemical Properties and Biocompatibility of Phosphate–Vanadate Hydroxyapatite Co-Doped with Tb<sup>3+</sup> and Sr<sup>2+</sup> Ions. *Nanomaterials* 2023, 13, 457.
3. Nowak, N., Czekanowska, D., Reeks, J. M., & Wiglusz, R. J. (2022). Structural, Spectroscopic, and Biological Characterization of Novel Rubidium(I) and Europium(III) Co-Doped Nano-Hydroxyapatite Materials and Their Potential Use in Regenerative Medicine. *Nanomaterials* 2022, 12, 4475.



Rozprawa przedstawiona została w formie przewodnika, w którym zaprezentowane zostały najważniejsze osiągnięcia, uzupełnione o kopie prac wchodzących w skład rozprawy (jedna wraz z suplementem). Doktorantka zamieściła również opis swojego dorobku naukowego wraz z listą publikacji tematycznie niezwiązanych z rozprawą doktorską, których jest współautorką (7 prac) oraz udział w konferencjach naukowych, co pozwala na szerszy ogląd Jej aktywności naukowej.

W przewodniku (100 stron wraz z publikacjami) Doktorantka przedstawiła wstęp teoretyczny, cel i założenia pracy, opis wykorzystanej metodologii, wyniki w formie krótkich zapowiedzi artykułów wchodzących w skład rozprawy oraz wnioski i podsumowanie, po których znajduje się bibliografia zawierająca 179 pozycji literaturowych. We wstępie Autorka wyposaża czytelnika w podstawową wiedzę dotyczącą regeneracji tkanki kostnej i nerwowej w ujęciu medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej, nanostrukturalnych związków o strukturze hydroksyapatytu i ich zastosowaniu w medycynie oraz charakterystyki fizyko-chemicznej i biologicznej jonów metali wybranych do domieszkowania badanych materiałów. W części eksperymentalnej prezentuje metodologię prowadzonych badań, wskazując krótko metody syntezy oraz wyjaśniając kluczowe aspekty metodologii wykorzystywanej do opisu właściwości fizyko-chemicznych oraz testów biologicznych.

Kolejny rozdział poświęcony jest prezentacji wyników badań. Tutaj, cele i założenia pracy zostały zawężone do syntezy i charakterystyki nowych proponowanych materiałów. Doktorantka nie stawia hipotezy badawczej dotyczącej oczekiwanego wpływu na strukturę czy właściwości fizyko-chemiczne. Wskazuje na biologiczne znaczenie domieszkowanych jonów wanadanowych ( $\text{VO}_4^{3-}$ ),  $\text{Sr}^{2+}$  oraz  $\text{Rb}^+$ , które, jak wynika z przytoczonej literatury, powinny poprawić właściwości regeneracyjne tkanki kostnej czy tkanek towarzyszących (takich jak włókna nerwowe) oraz wspomóc proces leczenia urazów kostnych (np. w przypadku osteoporozy). Wzbogacanie syntetycznych apatytów domieszką jonów ziem rzadkich ( $\text{Eu}^{3+}$  lub  $\text{Tb}^{3+}$ ) uzasadnione jest oczekiwaniem poprawy właściwości luminescencyjnych i możliwością wykorzystania w bioobrazowaniu komórek i tkanek, czy monitorowania dostarczania leków.

W poszczególnych podrozdziałach Doktorantka powtarza, jakimi metodami fizykochemicznymi posłużyła się w celu scharakteryzowania otrzymanych materiałów (tj. przy użyciu metody proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRPD), skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), spektroskopii w podczerwieni wykonanej metodą wielokrotnego osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ATR-FTIR), atomowej spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) oraz spektroskopii fotoluminescencyjnej). Szczegółowy opis wyników oraz analizę danych eksperymentalnych znajdujemy w przedstawionych artykułach. W kolejnym etapie przedstawia badania biologiczne, które stanowiły istotny element weryfikacji kompatybilności związków wobec wybranych żywych komórek, a zatem przydatności proponowanych materiałów. W ramach badań przeprowadziła m.in. test cytotoksyczności, ocenę żywotności komórek za pomocą techniki mikroskopii fluorescencyjnej, test hemolityczny oraz ocenę morfologii krwinek czerwonych za pomocą techniki mikroskopii świetlnej. Fakt, że powolne i stopniowe uwalnianie jonów metali z proponowanych materiałów może wspomagać regenerację tkanki kostnej i nerwowej, skłonił Panią mgr do zbadania uwalniania jonów metali do roztworu symulowanego płynu ustrojowego.

Uważam, że część doświadczalna pracy doktorskiej została odpowiednio zaplanowana, a interpretacja, prezentacja i omówienie wyników są przeprowadzone w systematyczny, aczkolwiek dość schematyczny sposób. Bardzo ogólny opis wyników analiz fizyko-chemicznych czy biologicznych przedstawiony w przewodniku nie ułatwia czytelnikowi znalezienia cech wyróżniających proponowane materiały. Niestety, w mojej opinii, zarówno w opracowaniu, jak i publikacjach, brakuje pogłębionej



dyskusji porównującej proponowane materiały i ich cechy do innych materiałów opisanych w literaturze. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o przedstawienie takiego porównania. Myślę, że może ono pozwolić usystematyzować główne kierunki proponowanych modyfikacji, wskazać ich zalety i wady oraz lepiej projektować kolejne materiały w przyszłości.

W ostatnim rozdziale dysertacji mgr Nowak bardzo krótko podsumowała wyniki swoich badań, podkreślając interesujące właściwości strukturalne, luminescencyjne i kompatybilność biologiczną poszczególnych nanokrystalicznych materiałów o strukturze hydroksyapatytu.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgr Nicole Nowak, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej zaliczam:

- Zaprojektowanie oraz syntezę kilku serii nowych nanomateriałów o strukturze hydroksyapatytu współdomieszkowanych jonami ziem rzadkich ( $\text{Eu}^{3+}$  lub  $\text{Tb}^{3+}$ ) oraz metali o znaczeniu biologicznym ( $\text{Sr}^{2+}$  oraz  $\text{Rb}^{+}$ ). Przebadano następujące serie związków:

(i) nanomateriały domieszkowane jonami  $\text{Eu}^{3+}$ , w których grupy fosforanowe ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) zostały stopniowo zastąpione grupami wanadanowymi ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) od 1 do 6;

(ii) nanomateriały domieszkowane jonami  $\text{Tb}^{3+}$  oraz  $\text{Sr}^{2+}$ , w których grupy fosforanowe ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) zostały podstawione dwoma grupami wanadanowymi ( $\text{VO}_4^{3-}$ );

(iii) nanomateriały domieszkowane jonami  $\text{Eu}^{3+}$  oraz  $\text{Rb}^{+}$ .

- Określenie wpływu liczby grup wanadanowych zastępujących grupy fosforanowe oraz domieszkowanych jonów metali na strukturę krystaliczną matrycy hydroksyapatytowej, jej morfologię, właściwości fizyko-chemiczne oraz właściwości luminescencyjne jonów  $\text{Eu}^{3+}/\text{Tb}^{3+}$  wbudowanych w matrycę apatytową (zmiany intensywności poszczególnych pasm przejść jonów lantanowców oraz przejść z przeniesieniem ładunku, zmiany czasów życia i kinetyki zaniku luminescencji) wraz ze wzrastającym stężeniem dyskutowanych jonów w badanych materiałach.

- Wykazanie kompatybilności otrzymanych związków wobec wybranych linii komórkowych (m.in. osteoblastów mysich, ludzkich fibroblastów skórnych czy wobec erytrocytów owczych), a zatem otrzymanie materiałów o obiecujących właściwościach w perspektywie ich dalszych badań w kierunku zastosowań w bioobrazowaniu, inżynierii tkankowej oraz medycynie regeneracyjnej.

Jak przytoczono we wstępie recenzji, rozprawa doktorska opiera się na wynikach, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu – *Nanomaterials* (o łącznym współczynniku wpływu  $\Sigma\text{IF} = 15.9$  i 210 punktach MNiSW).

W dwóch artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką, i również w dwóch autorką korespondencyjną, co podkreśla Jej wiodący udział. Choć w przewodniku brakuje opisu wkładu Doktorantki w przygotowanie publikacji, jak i oświadczeń współautorów, na podstawie wskazania zakresu udziału przedstawionego w opublikowanych artykułach można wywnioskować, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła w przygotowaniu koncepcji badań, prowadziła syntezę i charakterystykę fizyko-chemiczną związków, badania biologiczne, interpretację otrzymanych wyników oraz brała udział w przygotowaniu manuskryptów. Bez wątplenia zdobyła warsztat badawczy w zakresie prowadzonych eksperymentów oraz umiejętność prezentacji otrzymanych wyników. Należy podkreślić, że nie mam zatem wątpliwości, że wkład pracy Doktorantki w przygotowanie cyklu publikacji był znaczący i świadczy o Jej dojrzałości naukowo-badawczej.

Poniżej, wymieniam dodatkowe pytania pojawiające się po lekturze rozprawy doktorskiej i prac:



1. Jaki jest state-of-the-art dla grupy badanych materiałów na bazie hydroksyapatytów domieszkowanych właśnie jonami lantanowców – czy jakieś z nich znalazły już zastosowanie w medycynie? Poproszę Doktorantkę o krótką prezentację osiągnięć w tym zakresie.

2. W badaniach uwalniania pierwiastków wchodzących w skład matrycy hydroksyapatytu do roztworu symulowanego płynu ustrojowego (*Nanomaterials* 2022, 12, 77, Tabela 2 i 3) pokazano znaczny wzrost stężenia uwalnianego wanadu (szczególnie po 24h), co odróżnia ten pierwiastek od zachowania wapnia i fosforu, dla których różnice są niemal niezależne od czasu inkubacji. Jak można ten fakt wytłumaczyć?

3. Dlaczego badania kompatybilności prowadzone były na różnych liniach komórkowych? Czy do badań wybrano jakieś adekwatne związki referencyjne? Czy po tych wstępnych badaniach Doktorantka może pokusić się o analizę i korelację struktura - stężenie materiału - aktywność? Zastanawia też dlaczego Doktorantka pisze o zaskakujących rezultatach analizy właściwości biologicznych (str. 92)? Co Panią zaskoczyło? Co Autorka ma na myśli mówiąc o największej aktywności metabolicznej obserwowanej po 24 godzinnej inkubacji w najwyższym stężeniu 100 µg/ml (str. 71)? Czy chodzi o zdolność komórek do proliferacji? Czy badania tego typu dla biomateriałów nie powinny być prowadzone w dłuższej skali czasowej?

Na koniec, zwracam uwagę na błędne określenia i niefortunne zapisy, wśród których wymienię:

- grupa wanadowa, zamiast wanadanowa (str. 42),
- błędny zapis skrótu dodecylosiarczanu sodu – prawidłowy skrót to SDS, a nie DMSO,
- dużą niestaranność edytorską i bardzo liczne błędy językowe i stylistyczne.

Powyższe błędy nie mają wpływu na wartość merytoryczną przedstawionych treści.

Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany. Rozprawa doktorska przedstawiona w formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych prezentuje istotny wkład Pani mgr Nicole Nowak w poszerzenie wiedzy w zakresie otrzymywania i charakterystyki nowych materiałów nanokrystalicznych na bazie hydroksyapatytu. Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia eksperymentalnej pracy naukowej. Przeprowadzone badania jasno potwierdzają jak ważne jest szczegółowe badanie zależności między składem, strukturą chemiczną a właściwościami dyskusowanego typu nanomateriałów. Nieodzownym elementem jest też wykazanie kompatybilności biologicznej badanych związków, pozwalające na dalsze projektowanie związków o pożądanych właściwościach. Podsumowując można śmiało stwierdzić, że podczas realizacji pracy doktorskiej otrzymano obiecujące materiały do potencjalnych zastosowań biomedycznych takich jak bioobrazowanie, inżynieria tkankowa, czy medycyna regeneracyjna.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Nicole Nowak spełnia w pełni ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U.2020 poz 85 z późn. zm.), i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Nicole Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Janiewicz - Katedra