



Dr hab. Beata Żołnowska

Gdańsk, 10.10.2025

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny GUMed

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Agnieszki Kubiś

pt. „Synteza i charakterystyka peptydów proregeneracyjnych oraz ich kompozytów z chitozanem do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej”

wykonanej pod kierunkiem naukowym

prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło i dr Natalii Karskiej

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego, prof. dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego, informującego o decyzji powołującej mnie na recenzenta pracy doktorskiej.

Podstawę prawną sporządzenia niniejszej recenzji stanowi ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W sporządzanej recenzji odnoszę się do wymagań określonych w ustawie, zgodnie z którymi rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej.

W ostatnich latach inżynieria tkanki kostnej stała się jednym z najszybciej rozwijających się obszarów biomedycyny, odpowiadając na rosnące potrzeby kliniczne związane z leczeniem ubytków kostnych, złamań patologicznych oraz chorób degeneracyjnych układu kostnego. Tradycyjne metody leczenia, takie jak przeszczepy autologiczne czy implanty metalowe, często wiążą się z ograniczeniami, w tym niedoborem materiału dawcy, ryzykiem odrzutu czy ograniczoną integracją biologiczną. W odpowiedzi na te wyzwania rozwijane są nowoczesne strategie regeneracyjne, które integrują podejścia biologiczne, materiałowe

i inżynieryjne, umożliwiając tworzenie rusztowań tkankowych zdolnych do wspierania proliferacji i różnicowania komórek oraz stymulowania procesów naprawczych w kości.

OCENA ORYGINALNOŚCI ROZWIĄZANIA PROBLEMU NAUKOWEGO

Rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Kubiś stanowi oryginalne i interdyscyplinarne rozwiązanie istotnego problemu medycznego, jakim jest skuteczna regeneracja tkanki kostnej w przypadku ubytków pourazowych, patologicznych czy wynikających z chorób przewlekłych. Choroby układu kostnego, takie jak osteoporoza czy choroba zwyrodnieniowa stawów, dotyczą miliony osób na całym świecie, a ich leczenie, zwłaszcza w populacji osób starszych, pozostaje wyzwaniem klinicznym. U osób powyżej 50-ego roku życia schorzenia kostne odpowiadają za niemal połowę wszystkich chorób przewlekłych, a ich przebieg często komplikuje niedostateczne unaczynienie, infekcje oraz ograniczona zdolność regeneracyjna tkanki.

W tym kontekście opracowanie nowych, bioaktywnych materiałów wspomagających odbudowę kości ma kluczowe znaczenie dla rozwoju medycyny regeneracyjnej. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania zaprojektowania i wytworzenia trzech typów kompozytów chitozanowo-bioszklanych zawierających peptydy proregeneracyjne: (1) z peptydem ug4, kowalencyjnie sprzężonym z chitozanem za pomocą łącznika maleimidowego; (2) z wolnym peptydem ug51, tworzącym mieszaninę z chitozanem i uwalniającym aktywne sekwencje w wyniku autohydrolizy; oraz (3) z fibrylami peptydowymi ug52, charakteryzującymi się wysoką stabilnością i kontrolowanym, długotrwałym uwalnianiem peptydów. Oryginalność rozwiązania polega nie tylko na zastosowaniu bioaktywnych peptydów, ale przede wszystkim na innowacyjnych mechanizmach ich integracji i uwalniania. Szczególnie nowatorskie jest wykorzystanie łączników maleimidowych oraz sekwencji rozpoznawanych przez enzym MMP-7, co umożliwia kontrolowane, enzymatyczne uwalnianie peptydów w miejscu implantacji, zgodnie z naturalnymi procesami przebudowy kości.

Zastosowana w pracy doktorskiej strategia projektowania biomateriałów pozwala na precyzyjne dostarczanie sygnałów biologicznych w odpowiednim czasie i miejscu, co znacząco zwiększa skuteczność terapii. Praca łączy klasyczną chemię organiczną syntetyczną, chemię biomateriałów, inżynierię tkankową, biologię molekularną oraz medycynę eksperymentalną, co czyni ją przykładem interdyscyplinarnego projektu badawczego o wysokim potencjale translacyjnym. Opracowane materiały zostały poddane kompleksowej charakterystyce fizykochemicznej i biologicznej, a dla najbardziej obiecującego kompozytu przeprowadzono

badania implantacyjne *in vivo*, oceniające toksyczność ostrą oraz miejscową reakcję tkanki kostnej po wszczepieniu biomateriału.

Uzyskane wyniki nie tylko poszerzają wiedzę w zakresie projektowania biomateriałów, ale również tworzą podstawy dla przyszłych zastosowań klinicznych, co stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny naukowej oraz odpowiada na realne potrzeby współczesnej medycyny.

OCENA PREZENTACJI WIEDZY TEORETYCZNEJ ZAPREZENTOWANEJ PRZEZ AUTORA

Oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Kubiś prezentuje kompleksową i pogłębioną wiedzę teoretyczną w zakresie biologii tkanki kostnej, biomateriałów oraz inżynierii tkankowej, stanowiąc solidne podstawy dla prowadzonych badań eksperymentalnych. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością aktualnego stanu wiedzy, co znajduje odzwierciedlenie w starannie opracowanym przeglądzie literatury, obejmującym 284 pozycje bibliograficzne.

W części teoretycznej pracy Doktorantka szczegółowo omówiła hierarchiczną budowę kości, uwzględniając jej makro-, mikro- i nanostrukturę, co pozwala zrozumieć mechanizmy mechaniczne i biologiczne warunkujące funkcjonowanie tkanki kostnej. Następnie przedstawiła typy komórek kostnych (osteoblasty, osteoklasty, osteocyty) oraz ich rolę w przebudowie i homeostazie kości, podkreślając znaczenie równowagi między resorpcją a tworzeniem nowej tkanki.

Kolejne rozdziały poświęcone są procesowi gojenia się kości, który obejmuje fazę zapalną, proliferacyjną i przebudowy, oraz czynnikom wzrostu (np. BMP, VEGF, TGF- β) i ścieżkom sygnałowym (np. Wnt/ β -katenina, MAPK, PI3K/Akt), które regulują aktywność komórek kostnych i angiogenezę. Doktorantka wnikliwie analizuje bioaktywne peptydy jako czynniki wspomagające regenerację, dzieląc je na peptydy adhezyjne, osteoindukcyjne i angiogenne, wskazując ich mechanizmy działania oraz potencjał terapeutyczny.

Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła inżynierii tkanki kostnej, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowania polimerów, takich jak chitozan, jako nośników bioaktywnych cząsteczek. Autorka omówiła właściwości chitozanu (biokompatybilność, biodegradowalność, zdolność do tworzenia żeli i filmów), jego zastosowanie w wyrobach medycznych oraz metody jego funkcjonalizacji, w tym koniugację z peptydami za pomocą reakcji EDC/NHS, SPDP oraz łączników maleimidowych. Przybliżyła również zastosowanie tych koniugatów w biomedycynie, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w tworzeniu inteligentnych systemów dostarczania substancji czynnych.

Część teoretyczna rozprawy została opracowana z dużą starannością, logicznie uporządkowana i spójna z celami badawczymi. Autorka nie tylko przedstawiła aktualny stan badań, ale również wskazała konkretne luki badawcze, takie jak: brak systemów kontrolowanego uwalniania peptydów w odpowiedzi na lokalne warunki biologiczne, ograniczenia w funkcjonalizacji naturalnych polimerów oraz niedostateczna integracja oceny fizykochemicznej i biologicznej biomateriałów w kontekście ich zastosowania klinicznego. Takie ujęcie tematu świadczy o wysokim poziomie refleksji naukowej i dobrze uzasadnia podjęty kierunek badań.

OCENA UMIEJĘTNOŚCI PROWADZENIA PRACY NAUKOWEJ

Przedstawione w rozprawie doktorskiej osiągnięcie świadczy o wysokim poziomie samodzielności oraz zaawansowanych kompetencjach eksperymentalnych Doktorantki w zakresie projektowania i realizacji badań naukowych. Doktorantka wykazała się nie tylko umiejętnością prowadzenia kompleksowych badań laboratoryjnych, ale również zdolnością do krytycznej analizy wyników oraz ich interpretacji w kontekście aktualnych wyzwań medycyny regeneracyjnej.

Doktorantka zaprojektowała i z sukcesem zsyntetyzowała zestaw peptydów proregeneracyjnych oraz proregeneracyjnych i jednocześnie profibrylogennych. Przeprowadziła badania stabilności peptydów w wodzie i pożywce hodowlanej, badania cytotoksyczności i potencjału proliferacyjnego wobec ludzkich osteoblastów, a w przypadku peptydów fibrylogennych dodatkowo badania fibrylizacji i morfologii fibryli. Wyniki eksperymentów biologicznych i analiza ekonomiczna pozwoliły Doktorantce na wyselekcjonowanie peptydów i otrzymanie końcowych kompozytów.

W swojej pracy Doktorantka przedstawiła pogłębioną analizę skuteczności opracowanych kompozytów chitozanowo-bioszklanych zawierających peptydy proregeneracyjne. Porównała różne strategie integracji peptydów z matrycą chitozanową. Obejmowały one sprzęganie kowalencyjne, tworzenie mieszanin fizycznych oraz wykorzystanie fibryli peptydowych. Przeanalizowała ich wpływ na stabilność układów, mechanizm uwalniania i aktywność biologiczną, w tym cytotoksyczność, proliferację komórek osteoblastycznych oraz właściwości proregeneracyjne. Szczególną uwagę poświęciła zależnościom struktura-funkcja, takim jak obecność sekwencji rozpoznawanych przez enzym MMP-7, acetylacja końców peptydowych czy długość sekwencji aminokwasowej.

Doktorantka trafnie zidentyfikowała peptyd u_{g1} jako optymalny pod względem aktywności biologicznej, stabilności, kosztów syntezy oraz możliwości skalowania, co

świadczy o umiejętności podejmowania decyzji badawczych opartych na analizie wieloaspektowej. Wykazała również zdolność do rozwiązywania problemów analitycznych, m.in. poprzez opracowanie alternatywnej metody oznaczania stopnia modyfikacji chitozanu z wykorzystaniem chromatografii HILIC, co pozwoliło na wiarygodną ocenę efektywności sprzęgania.

Wyniki badań biologicznych i implantacyjnych, zrealizowane we współpracy z Centrum Badań Przedklinicznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Instytutem Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie – Sieć Badawcza Łukasiewicz, Politechniką Wrocławską oraz Instytutem Biotechnologii i Medycyny Molekularnej w Gdańsku, zostały przedstawione w sposób rzetelny i spójny. Interpretacja uzyskanych wyników uwzględniała zarówno ograniczenia metodyczne, jak i potencjał translacyjny opracowanych materiałów. Częściowe wyniki niniejszej pracy zostały uwieńczone zgłoszeniem patentowym, co dodatkowo potwierdza jej innowacyjny charakter oraz wysokie znaczenie aplikacyjne.

Uwzględniając przedstawione osiągnięcia, należy wysoko ocenić umiejętność prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę. W trakcie realizacji rozprawy wykazała się ona doskonałą organizacją pracy badawczej, obejmującą planowanie, realizację i koordynowanie eksperymentów w zróżnicowanym środowisku naukowym, obejmującym laboratoria chemiczne, biologiczne i kliniczne. Jednocześnie zdolność łączenia wiedzy z obszarów chemii, biologii, inżynierii materiałowej oraz medycyny eksperymentalnej świadczy o szerokich horyzontach badawczych Doktorantki i dojrzałości w podejściu interdyscyplinarnym.

Należy również podkreślić, że badania prowadzone przez Doktorantkę były finansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju oraz ze środków uczelnianych w ramach trzech grantów dla młodych naukowców, co potwierdza wysoki poziom merytoryczny realizowanych prac, a także umiejętność skutecznego pozyskiwania funduszy na realizację ambitnych projektów badawczych.

Struktura i forma pracy

Pod względem formalnym praca została przygotowana właściwie, uwzględniając poprawność językową, stylistyczną oraz interpunkcyjną. Układ i struktura pracy są standardowe dla tego typu opracowań. Praca zawiera wymagane elementy formalne, w tym streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wprowadzenie, cel pracy,

materiały i metody, badania własne, dyskusja wyników, wykaz dorobku, bibliografię oraz załączniki.

Pod względem redakcyjnym i graficznym praca przygotowana została starannie, liczy łącznie 247 stron numerowanych, zawiera 104 rysunki, 23 tabele i 284 pozycje piśmiennictwa cytowanego. Forma graficzna i redakcyjna pracy wspiera jej wartość merytoryczną, ilustracje są czytelne, a układ tekstu sprzyja płynnej lekturze. Język pracy jest spójny, zgodny z terminologią naukową właściwą dla dyscypliny, a styl wypowiedzi świadczy o wysokim poziomie kompetencji komunikacyjnych doktorantki.

W trakcie recenzowania pracy nasunęły mi się pytania, proszę o ich wyjaśnienie:

- Jak scharakteryzowałaby Pani otrzymane w pracy doktorskiej kompozyty w kontekście osteokondukcji, osteoindukcji i osteointegracji?
- Jaka była czystość peptydów ug1-9, 13, 20, 26-28, 54, 55, 51, 52, 53? W pracy nie zamieszczono tych informacji, a mają one istotne znaczenie dla badań enzymatycznych, oceny cytotoksyczności oraz właściwości stymulujących proliferację komórek.
- Czy testy cytotoksyczności i proliferacji byłyby równie miarodajne na innych liniach komórkowych?
- Biorąc pod uwagę, że Kompozyt 9 (ug52 w formie fibryli) nie wykazał uwalniania ug1 w testach *in vitro* (prawdopodobnie z powodu ograniczonej dostępności enzymu), jakie są predykcje i oczekiwania dotyczące tempa i profilu uwalniania ug1 z Kompozytu 9 w warunkach *in vivo* po 90 dniach (lub dłużej), kiedy to macierz chitozanowa ulega zaawansowanej degradacji i odsłonięciu uwięzionych fibryli?
- Chociaż badania toksyczności ostrej Kompozytu 5 były negatywne, czy istnieją dane określające potencjalną immunogenność specyficznych sekwencji peptydowych (ug4, ug46) w kontekście długoterminowej obecności w organizmie zwierzęcym (powyżej 90 dni)?
- Kompozyt przeznaczony do badań implantacyjnych (Kompozyt 5) poddano sterylizacji radiacyjnej dawką ok. 30 kGy. Czy przeprowadzono szczegółową analizę stabilności i aktywności biologicznej peptydów ug4 (kowalencyjnie przyłączonego) i ug46 (zaadsorbowanego) po ekspozycji na tę dawkę promieniowania?

Chciałabym również zwrócić uwagę na brak rozdziału podsumowującego (Podsumowanie), w którym zwykle przedstawia się najważniejsze wyniki i wnioski z przeprowadzonych badań.

Do obowiązków recenzenta należy także wskazanie zauważonych błędów popełnionych w trakcie przygotowywania manuskryptu rozprawy. Poniżej przedstawiam spostrzeżenia dotyczące zagadnień formalnych i redakcyjnych:

- Na str. 84 sugeruję, aby doprecyzować, że zastosowany roztwór 6M HCl jest roztworem wodnym.
- W tekście na str. 99 występuje literówka: zamiast „krętarz” powinno być „krętacz”.
- Na str. 126 w zdaniu „dopiero przy zastosowaniu warunków z wariantu 4 uzyskałam wyraźny sygnał od glicyny” sugerowałabym, aby doprecyzować, że chodzi o zderywatyzowaną glicynę.
- Na str. 134 (Rys. 60) produkt addycji Michaela do wiązania podwójnego został przedstawiony nieprawidłowo, powinien zawierać wiązanie pojedyncze, a nie podwójne.
- Na str. 179-180 błędnie podpisano Rysunek 100 - powinno być Rysunek 99. W tekście należy również poprawić odwołania tak, aby odnosiły się do Rysunku 99.
- Na str. 182 błędnie podpisano Rysunek 99 - powinno być Rysunek 100. W treści pracy należy również skorygować odwołania: powinno być Rysunek 100a i 100b, a nie 101a i 101b. Należy zwrócić uwagę, że konsekwencją tych błędów są nieprawidłowe numeracje kolejnych rysunków i odwołań w tekście aż do strony 203.
- Na str. 184 opis w tekście „Kompozyt 9 wykazał wysoką stymulację proliferacji osteoblastów - 152% względem kontroli” nie jest zgodny z danymi przedstawionymi na Rysunku 101, gdzie wartość dla kompozytu 9 nie przekracza 100%. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności.

Pragnę podkreślić jednak, że przedstawione uwagi mają głównie charakter techniczny, redakcyjny, natomiast w żadnym stopniu nie wpływają na wartość merytoryczną pracy.

Inna działalność naukowa

Doktorantka wykazała aktywną działalność naukową obejmującą zarówno, publikacje naukowe, udział w konferencjach jak i patentowanie wyników badań. Jest współautorką trzech publikacji w renomowanych, recenzowanych czasopismach naukowych: *Molecules*, *Chemistry & Biodiversity* oraz *Toxics*, opublikowanych w latach 2020-2021. Doktorantka uczestniczyła w 16 krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, prezentując wyniki badań w formie referatów i plakatów. Taka aktywność świadczy o jej gotowości do dzielenia się wiedzą oraz o umiejętności komunikowania wyników badań w środowisku naukowym.

Na szczególne uznanie zasługuje dorobek patentowy, Doktorantka jest współautorką 10 zgłoszeń patentowych, w tym 8 krajowych (UPRP) oraz 2 europejskich (EPO). Zgłoszenia te, w tym dotyczące peptydu ug4 oraz Kompozytu 5, potwierdzają wysoki poziom innowacyjności prowadzonych prac oraz ich potencjał wdrożeniowy.

Zaangażowanie Pani mgr inż. Agnieszki Kubiś w działalność badawczo-rozwojową zostało docenione na XVI Międzynarodowych Targach Wynalazków i Innowacji INTARG-2023, gdzie zdobyła nagrody: Platinum Medal INTARG, Gold Medal INTARG oraz Nagrodę Polskiej Izby Rzeczników Patentowych.

Podsumowując, praca Pani mgr inż. Agnieszki Kubiś wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym, rzetelnością wykonania oraz istotnym wkładem w rozwój badań nad chemicznymi podstawami biomateriałów i ich zastosowaniem w medycynie regeneracyjnej. Praca zasługuje na szczególne uznanie i z pewnością może być postrzegana jako wyróżniająca się na tle innych osiągnięć w tej dziedzinie. Niemniej jednak, z powodów formalnych nie mogę zgłosić wniosku o jej wyróżnienie.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kubiś pt. „Synteza i charakterystyka peptydów proregeneracyjnych oraz ich kompozytów z chitozanem do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej” wykonanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło i dr Natalii Karskiej stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). **Pracę oceniam pozytywnie.** Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kubiś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Beata Żołnowska

**Katedra i Zakład
Chemii Organicznej**

Beata Żołnowska
dr hab. Beata Żołnowska
adiunkt