



Prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Biologically Active Metalopeptides Group
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

Wrocław, 03.10.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Kubiś

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

Rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Kubiś stanowi ambitny i imponujący naukowo wkład w obszary chemii peptydów, inżynierii biomateriałów oraz inteligentnych systemów kontrolowanego uwalniania sygnałów proregeneracyjnych. Zrealizowana pod wzorcową opieką promotorską prof. dr hab. Sylwii Rodziewicz-Motowidło, z nieocenioną pomocą promotorki pomocniczej, dr Natalii Karskiej, w najwyższej klasy zapleczu Katedry Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, praca ta doskonale wpisuje się w profil badawczy zespołu, łącząc znakomite umiejętności syntetyczne z zaawansowaną charakterystyką fizykochemiczną i materiałową oraz przekonującą walidacją biologiczną *in vitro* oraz *in vivo*. Dysertacja prezentuje nowatorskie kompozyty peptydowo-chitozanowe o enzymatycznie sterowanym uwalnianiu i realnym potencjale translacyjnym.

Rozprawa została przygotowana w formie tradycyjnej; ma klarowny układ rozdziałów i obejmuje wszystkie elementy wymagane przez stosowne przepisy (spis treści, streszczenia PL/EN, wykaz skrótów, wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusja, wnioski, bibliografia). Poszczególne rozdziały zgrabnie podsumowują najistotniejsze wyniki danego modułu badawczego, a szczegóły techniczne i parametry eksperymentalne są konsekwentnie przeniesione do sekcji „Materiały i metody” oraz do załączników/publikacji, do których Autorka odsyła w tekście. To elegancki zabieg edytorski, który utrzymuje płynność narracji i nie rozprasza czytelnika „ciężarem” opisu eksperymentalnego w głównym toku.

Praca otwiera się spisem treści, po którym następuje krótkie, rzeczowe przedstawienie dorobku naukowego Doktorantki oraz streszczenia w języku polskim i

angielskim. W Rozdziale 1 Autorka syntetycznie przedstawia najważniejsze informacje wprowadzające w tematykę pracy – od biologii gojenia kości i roli peptydów sygnałowych, przez właściwości chitozanu i bioszkieł, po uzasadnienie wyboru enzymatycznie sterowanego uwalniania, sytuując własne badania w aktualnym kontekście literatury.

Kolejno określa główny cel rozprawy, którym jest opracowanie innowacyjnych, peptydowo chitozanowych materiałów kompozytowych do regeneracji tkanki kostnej, w których uwalnianie bioaktywnych sygnałów jest sterowane lokalnymi warunkami biologicznymi (w szczególności aktywnością MMP 7), a następnie ich wszechstronna charakterystyka strukturalna, fizykochemiczna i biologiczna. Cel ten Autorka rozkłada na szereg celów podrzędnych: (i) zaprojektowanie i synteza kandydatów peptydowych zawierających motyw rozpoznawany przez MMP 7 oraz selekcja sekwencji referencyjnej o najwyższej aktywności; (ii) zaprojektowanie i otrzymanie aktywnego odczynnika maleimidowego oraz optymalizacja i walidacja modyfikacji chitozanu; (iii) otrzymanie i charakterystyka koniugatów chitozan-peptyd wraz z weryfikacją enzymatycznie sterowanego uwalniania aktywnego fragmentu; (iv) zaprojektowanie peptydu zdolnego do kontrolowanej samoorganizacji w fibryle pełniące rolę długotrwałego magazynu; (v) przygotowanie i porównanie trzech klas układów (koniugaty kowalencyjne, mieszaniny fizyczne oraz kompozyty z fibrylami) oraz (vi) ich kompleksowa ocena – od profili uwalniania i analizy strukturalnej po testy *in vitro* i *in vivo*. W mojej ocenie wszystkie te cele zostały zrealizowane w pełni i z należytą starannością; każdy z kroków domknięto zestawem wzajemnie potwierdzających się danych, a logika decyzji projektowych jest celowa i przejrzysta.

Najciekawszą częścią pracy jest niewątpliwie ta, która opisuje główne wyniki, czyli inteligentne dostarczanie sygnału proregeneracyjnego do miejsca ubytku trzema komplementarnymi ścieżkami: (i) poprzez peptyd prekursor z wbudowanym motywem cięcia MMP 7, przyłączony do chitozanu w sposób stabilny w warunkach fizjologicznych, lecz podatny na wyzwolenie aktywnego fragmentu w obecności docelowego enzymu; (ii) poprzez układ, w którym peptyd mieszany z chitozanem ulega kontrolowanej autohydrolizie do krótszych, funkcjonalnych fragmentów i (iii) poprzez samoorganizujące się fibryle peptydowe, pełniące rolę długotrwałego

Prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Biologically Active Metalopeptides Group
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

rezerwuaru. Autorka rozpoczyna od szerokiej syntezy biblioteki sekwencji aż szesnastu(!) peptydów (Fmoc SPPS, aparatura mikrofalowa), a następnie prowadzi preselekcję funkcjonalną: wybór sekwencji referencyjnej, jej prekursora i konstrukcji z N terminalną cysteiną umożliwiającą sprzężenie z maleimidem. Chromatografia (RP-HPLC) i spektrometria mas (MALDI-TOF) jasno pokazują, że MMP-7 przecina prekursor i uwalnia aktywny fragment, czyli układ działa dopiero w obecności tego enzymu.

Równie świetnie opracowanym elementem pracy jest część materiałowa - zaprojektowanie aktywnego estru maleimidoglicyny, jego rzetelna charakterystyka (HPLC, FTIR, NMR) oraz świadome dobranie warunków modyfikacji chitozanu (kontrola pH, rozpuszczalnika, czasu, procedury mieszania) tworzą rewelacyjną bibliotekę nośników. Koniugacja peptydu poprzez addycję do pierścienia maleimidowego jest przeprowadzona z należytą dbałością o stabilność grup tiolowych, a sukces reakcji i czystość produktów potwierdzają analizy chromatograficzne i spektroskopowe. Dzięki tej doskonałości warsztatowej dalsze obserwacje biologiczne mają solidny fundament.

Wątek samoorganizacji peptydów jest poprowadzony modelowo: Autorka łączy test oddziaływania z ThT, pomiary dichroizmu kołowego oraz obrazowanie TEM, by nie tylko wykazać obecność struktur włóknistych, ale i scharakteryzować ich morfologię (długości, średnice, skręcenia) oraz dynamikę powstawania. Zastosowanie fibryli jako „inteligentnego magazynu” dla sekwencji aktywnej i wykazanie ich podatności na enzymatyczne cięcie przez MMP 7 pozwalają zaproponować mechanistycznie uzasadniony, przedłużony profil uwalniania.

Równie starannie zaprojektowano ocenę biologiczną: zgodność z normami cytotoksyczności, wpływ na proliferację osteoblastów i (co imponujące) model implantacyjny u zwierząt. Wyniki są spójne: wybrane kompozyty wyraźnie pobudzają namnażanie komórek, a kandydat do badań in vivo zachowuje się tak, jak oczekujemy od skutecznego rusztowania - integruje się z tkanką, nie wywołuje niepożądanego stanu zapalnego i sprzyja odbudowie kości. To przenosi rozwiązanie z

poziomu badań podstawowych do etapu realnej gotowości do dalszego rozwoju translacyjnego.

Reasumując – mgr inż. Kubiś płynnie i klarownie łączy syntezę, badania fizykochemiczne i materiałowe z eksperymentami biologicznymi, wspiera wszystkie twierdzenia solidnymi dowodami, właściwie korzysta z zaawansowanych narzędzi badawczych i umieszcza swoje odkrycia w szerokim, odpowiednim kontekście. Recenzowana rozprawa jest dojrzałym, interdyscyplinarnym opracowaniem łączącym racjonalne projektowanie krótkich peptydów o działaniu proregeneracyjnym, zaawansowaną chemię modyfikacji chitozanu oraz przekonującą walidację biologiczną – od badań *in vitro* po model zwierzęcy *in vivo*. Na każdym etapie pracy widoczny jest wysoki standard metodologiczny i uważna dokumentacja, co w połączeniu ze znakomitym zapleczem laboratoryjnym i dojrzałą opieką promotorską przekłada się na spójność i wiarygodność całego przedsięwzięcia.

Omawiana rozprawa rodzi liczne pytania i zachęca czytelnika do skłonienia autorki, aby wysnuła hipotezy dotyczące znaczenia uzyskanych wyników:

1. Czy na podstawie zgromadzonych danych rozważano zbudowanie prostego modelu kinetycznego (np. reakcji pseudo I rzędu) dla cięcia motywu rozpoznawanego przez MMP 7, tak, aby przewidywać tempo uwalniania peptydu w kolejnych fazach gojenia? Model kalibrowany danymi LC/MS mógłby teoretycznie pomóc w takich rozważaniach.
2. Sprzężenie z maleimidem prowadzi do mostka tioeterowego; czy rozważano testowanie stabilności koniugatu w warunkach stresu oksydacyjnego (np. H_2O_2 , Fe^{2+} /askorbinian), zbliżonych do środowiska zapalnego? Takie badania dodałyby argumentów na rzecz długoterminowej trwałości układu.
3. Czy planowane są systematyczne pomiary właściwości mechanicznych kluczowych kompozytów (moduł Younga, wytrzymałość na ściskanie) i korelacja tych

Prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Biologically Active Metalopeptides Group
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

parametrów z porowatością i tempem degradacji? Mogłoby to być ważne dla przewidywania zachowania w obciążonym środowisku kostnym.

4. Czy podejmowano próby identyfikacji (MS/MS) dominujących fragmentów powstających w trakcie autohydrolizy peptydu prekursora? W teorii pomogłoby to zawęzić minimalną sekwencję aktywną.

5. Bardzo ogólne pytanie – z którego wyniku jest Pani najbardziej dumna?

Uwagi zawarte w recenzji wynikają głównie z ciekawości i nie wpływają na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, sposób jej przedstawienia ani na wnioski z niej płynące.

Główna część rozprawy została napisana na 209 stronach, zawiera 103 rysunki i cytuje 284 pozycje literaturowe. Została uzupełniona wykazem publikacji oraz czterema załącznikami, które opisują szczegóły wybranych procedur eksperymentalnych. Praca jest napisana w sposób klarowny i precyzyjny, a jednocześnie jest bardzo „lekka” i przyjemna w odbiorze – da się zauważyć, że Doktorantka ma tzw. „lekkie pióro”.

W ogólnej ocenie, praca jest bardzo dobrze napisana, a badania przeprowadzone przez mgr inż. Kubiś i przedstawione w rozprawie stoją na bardzo wysokim poziomie. Nie zauważyłam ani żadnych poważnych błędów, ani braków, ani nawet drobnych kwestii edytorskich, o których mogłabym wspomnieć.

Wyniki pracy zostały opisane w trzech bardzo dobrych artykułach, związanych bezpośrednio z tematem rozprawy; dwie kolejne prace są na etapie przygotowania. Ponadto, Doktorantka jest współautorką dziesięciu zgłoszeń patentowych, a swoje osiągnięcia prezentowała na 16(!) konferencjach.

Praca mgr inż. Agnieszki Kubiś formułuje oryginalny i istotny naukowo problem, proponuje nowatorskie, wielowarstwowe rozwiązanie, dostarcza bogatego i spójnego zestawu danych (chemicznych, materiałowych i biologicznych) oraz wytycza czytelną ścieżkę rozwoju translacyjnego. Zwracam szczególną uwagę na klarownie postawiony cel nadrzędny i konsekwentnie zrealizowane cele szczegółowe – wszystkie zostały osiągnięte z nawiązką. Znakomita jakość warsztatu i dojrzałość interpretacji, w połączeniu z bardzo dobrym dorobkiem Autorki i świetnym standardem laboratoriów, w których wykonano badania, uzasadniają najwyższą ocenę. Kandydatka wykazała



Prof. dr hab. inż. Magdalena Rowińska-Żyrek
Biologically Active Metalopeptides Group
Faculty of Chemistry, University of Wrocław
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@uwr.edu.pl

się wysokim stopniem samodzielności badawczej oraz umiejętnością wszechstronnej analizy wybitnie interdyscyplinarnych wyników, co zasługuje na szczególne uznanie. Szczerze ubolewam nad wygórowanymi regułami dotyczącymi wyróżnień rozpraw doktorskich w Dyscyplinie Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego; gdyby nie one, z pełnym przekonaniem wnioskowałabym o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Kandydatki, opierając się na bardzo pozytywnej ocenie pracy, jej istotnym wpływie na rozwój dziedziny, wybitnie interdyscyplinarnym charakterze, imponujących, naukowo istotnych osiągnięć zawartych w rozprawie oraz na jej wyjątkowo wysokim poziomie merytorycznym.

W związku z powyższym potwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i, moim zdaniem, nie tylko spełnia, ale i znacznie przewyższa wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z przepisami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), gorąco rekomenduję Radzie Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kubiś do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem,

Magdalena Rowińska-Żyrek