



Lublin, dn. 07.06.2021 r.

Dr hab. n. farm. Agata Przekora-Kuśmierz
Profesor uczelni
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Szurkowskiej pt. „*Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i magnezu jako nośniki raloksyfenu*” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Kolmas w Katedrze Chemii Analitycznej i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi cykl czterech publikacji zebranych pod wspólnym tytułem „*Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i magnezu jako nośniki raloksyfenu*”. Na cykl artykułów składa się 1 praca przeglądowa oraz 3 prace oryginalne. Wszystkie przedłożone artykuły dotyczą syntezy nowatorskich biomateriałów (bioceramiki lub granul kompozytowych) do zastosowań w leczeniu ubytków kostnych ze szczególnym uwzględnieniem złamań osteoporotycznych. Ponadto przedstawione artykuły badawcze prezentują pełną charakterystykę fizykochemiczną opracowanych biomateriałów oraz podstawowe testy biologiczne z wykorzystaniem hodowli komórek eukariotycznych w warunkach *in vitro*. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) wskazanych artykułów według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 15,134. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej w latach 2017-2021. Prace wchodzące w skład cyklu są wieloautorskie (od 2 do 4 autorów). Jednak należy podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym autorem w każdym z tych artykułów, co świadczy o jej wiodącej roli w ramach powstawania współautorskich publikacji. Ponadto z pisemnych oświadczeń Doktorantki oraz współautorów publikacji wynika, że jej wkład w powstanie każdej pracy był na poziomie 70-80%, a ona sama bezpośrednio uczestniczyła w prowadzonych badaniach naukowych, interpretacji wyników oraz przygotowywaniu manuskryptu. Nie mam zatem wątpliwości, że wkład mgr Katarzyny Szurkowskiej w powstanie cyklu publikacji stanowiącego rozprawę doktorską jest większościowy.



Temat podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w bardzo aktualny i istotny z punktu widzenia klinicznego nurt badań z zakresu inżynierii biomateriałów oraz medycyny regeneracyjnej. Celem prowadzonych przez Doktorantkę badań było opracowanie metody syntezy wysokiej jakości biomateriałów, mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu złamań osteoporotycznych. Wytworzone przez Doktorantkę biomateriały są wzbogacone w jony krzemu oraz magnezu aby przyspieszać regenerację tkanki kostnej po ich implantacji. Wariant biomateriału wzbogacony w raloxyfen może dodatkowo służyć jako nośnik leku, hamujący aktywność osteoklastów w miejscu implantacji.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Szurkowskiej została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Obejmuje ona spis treści, wykaz skrótów i akronimów, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim oraz opis osiągnięcia naukowego, w którym w skrócie omówiono podjętą problematykę badawczą oraz najważniejsze wyniki badań. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na pewne drobne niejasności, które warto wyjaśnić aby Doktorantka nie powieliła tych błędów w przyszłości podczas swojej pracy naukowej. W rozdziale 1.6. zatytułowanym „Materiały kompozytowe”, Doktorantka napisała *„Aby upodobnić materiał implantacyjny do struktury tkanki kostnej tworzy się materiały hybrydowe, złożone z substancji nieorganicznej (najczęściej CaP), umieszczonej w matrycy organicznej, polimerowej. Takie połączenie umożliwi wykorzystanie zalet poszczególnych frakcji budujących kompozyt.”* Z tego fragmentu wynika, że pojęcie „hybryda” oraz „kompozyt” są dla Doktorantki tożsame. Wymienne stosowanie tych dwóch pojęć jest bardzo często spotykane w dostępnym piśmiennictwie i przez to ten błąd jest również często powielany. Z tego względu pozwolę sobie na wyjaśnienie różnicy między tymi dwoma typami biomateriałów. Podczas tworzenia materiałów hybrydowych dochodzi do powstawania interakcji chemicznych pomiędzy składnikami, dlatego w konsekwencji powstaje materiał o zupełnie nowych cechach w porównaniu do cech poszczególnych jego składników. Natomiast kompozyty tworzy się poprzez proste zmieszanie poszczególnych komponentów bez utworzenia oddziaływań chemicznych. Zatem kompozyt posiada cechy będące sumą cech poszczególnych jego składników. W skrótowym opisie cyklu artykułów pojawiło się również nieprawidłowe stwierdzenie dotyczące przeprowadzenia testu z wykorzystaniem hodowli komórek *in vitro*. Doktorantka napisała *„Sterylne próbki umieszczano ostrożnie na zestalonej warstwie agaru pokrytej monowarstwą komórek”*. W przeciwieństwie do bakterii, komórki eukariotyczne nie są hodowane na powierzchni agaru, tylko na dnie polistyrenowego dołka. Następnie tak przygotowana monowarstwa



komórek jest przykrywana cienką warstwą agaru zmieszanego z podłożem hodowlanym. Artykuł P2, który opisuje ten eksperyment, przedstawia prawidłowy opis metodyki. Biorąc pod uwagę fakt, że zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami autorów ten eksperyment był wykonywany we współpracy z inną jednostką naukową, zakładam, że Doktorantka popełniła błąd podczas tłumaczenia artykułu na język polski. Niemniej jednak jako Recenzent oraz osoba z wieloletnim doświadczeniem w zakresie wykorzystywania modeli komórkowych do testowania biomateriałów w warunkach *in vitro*, czuję się w obowiązku zwrócić uwagę na ten błąd w tłumaczeniu.

Artykuł pierwszy (P1) z cyklu jest to praca przeglądowa opisująca możliwe zastosowania biomedyczne hydroksyapatytu wzbogaconego w krzem oraz omawiająca wpływ tego typu ceramiki na regenerację kości. Artykuł ten stanowi rodzaj wstępu do tematyki podjętej przez Doktorantkę w ramach badań doktorskich. Artykuł drugi (P2) przedstawia syntezę nanoproszku hydroksyapatytowego wzbogaconego w jony krzemu i magnezu oraz jego pełną charakterystykę fizykochemiczną (FTIR, NMR, ICP-OES, TEM) i ocenę cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych zgodnie z normą ISO 10993-5. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na pewną nieprawidłowość związaną z wykonanym testem cytotoksyczności. Wspomniana norma ISO wymaga zastosowania hodowli komórek subkonfluentnej (tzn. 80-90% dna naczynia hodowlanego powinna być pokryta warstwą komórek), natomiast zgodnie z opisem metodyki zastosowano hodowlę komórek w 50% konfluentną, co mogło znacząco wpłynąć na końcowy rezultat badań. Chociaż w przypadku materiałów nietoksycznych, taki błąd związany z zastosowaniem zaniżonej gęstości komórek nie powinien mieć wpływu na końcowy rezultat, pozwoliłam sobie wskazać tę nieprawidłowość, aby Doktorantka w przyszłości nie powielala tego błędu, uzyskując bardziej rzetelne wyniki badań. Wytworzone w ramach pracy P2 nanoproszki hydroksyapatytu zostały następnie wykorzystane do produkcji granul kompozytowych na bazie alginianu i siarczanu chondroityny, które zostały scharakteryzowane za pomocą SEM oraz ICP-OES. W trzecim artykule badawczym (P3) Doktorantka opracowała skuteczną metodę otrzymywania α -TCP bogatego w jony krzemu, który może znaleźć potencjalne zastosowanie biomedyczne do leczenia ubytków kostnych. W ramach tej pracy wytworzona bioceramika została poddana kompleksowej charakterystyce fizykochemicznej (PXRD, NMR, FTIR, spektroskopia Ramana, TEM, SEM). Efektem badań przeprowadzonych w ramach artykułu P2 oraz P3 było otrzymanie szeregu fosforanów wapnia domieszkowanych różną ilością magnezu i krzemu, wykazujących optymalny profil uwalniania jonów krzemu, co potencjalnie może wykazywać



długotrwały pozytywny efekt na proces kościotworzenia po implantacji. Artykuł czwarty (P4) z cyklu jest uwieńczeniem całego logicznego ciągu badań. W ramach pracy P4 Doktorantka wykorzystwała opracowane wcześniej nanoproszki hydroksyapatytu domieszkowane jonami krzemu i magnezu do produkcji kompozytowych granul wzbogaconych dodatkowo w lek o działaniu hamującym aktywność osteoklastów – raloksyfen. Kompozytowe granule alginianowo-hydroksyapatytowe były wytwarzane z domieszką innych biopolimerów: siarczanu chondroityny, keratyny lub ich mieszaniny. Wytworzone granule zostały poddane ocenie porowatości (SEM, MIP), morfologii powierzchni (SEM), wytrzymałości mechanicznej, profilu uwalniania jonów magnezu i krzemu oraz raloksyfenu. Ponadto dokonano oceny wpływu wytworzonych granul kompozytowych na żywotność ludzkich osteoblastów oraz komórek kostniakomięska. Doktorantka wykazała, że skład granul jednoznacznie wpływał na uwalnianie raloksyfenu. Co ważne, lek był uwalniany stopniowo wraz z powolnym pęcznieniem i degradacją granul. Ponadto kompozyty zawierające lek wykazywały większą toksyczność w stosunku do komórek kostniakomięsaka niż do komórek prawidłowych, co wskazuje na dodatkową możliwość wykorzystania klinicznego opracowanych biomateriałów po resekcji nowotworu.

Doktorantka zrealizowała w pełni cele badawcze przy użyciu bogatej metodyki z zakresu analizy fizykochemicznej i mikrostrukturalnej biomateriałów. Praca doktorska przedstawia również podstawowe, ale bardzo ważne z punktu widzenia certyfikacji wyrobów medycznych, badania biologiczne *in vitro* wg normy ISO 10993-5. Jako ekspert z zakresu wykorzystywania modeli komórkowych do oceny przedklinicznej biomateriałów, czuję pewien niedosyt jeśli chodzi o charakterystykę biologiczną biomateriałów. Bardzo wartościowym dodatkiem do artykułów P2 oraz P3 byłaby ocena wpływu uwolnionych z bioceramiki jonów magnezu i krzemu na proces różnicowania osteogennego. W ten sposób Doktorantka potwierdziłaby założoną hipotezę badawczą, że wzbogacenie bioceramiki we wspomniane jony będzie mieć pozytywny wpływ na proces kościotworzenia. Niemniej jednak nie jest to uwaga, a raczej drobna sugestia dotycząca przyszłych kierunków badawczych. Jakość i obiektywizm zastosowanych metod nie budzi żadnych zastrzeżeń. Część analiz biomateriałów (m.in. badania biologiczne z wykorzystaniem hodowli komórek *in vitro*) została wykonana we współpracy naukowej z innymi jednostkami naukowymi, co wskazuje na interdyscyplinarność prowadzonych badań i świadczy o umiejętności nawiązywania kontaktu i otwartości Doktorantki na współpracę naukową. Warto przy tym



zaznaczyć, że wszystkie analizy fizykochemiczne opracowanych biomateriałów zostały wykonane wyłącznie przez Doktorantkę.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Katarzyny Szurkowskiej pt. „*Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i magnezu jako nośniki raloksyfenu*” przedstawiona jako cykl powiązanych tematycznie publikacji jest bardzo wartościowym dziełem z zakresu nauk farmaceutycznych oraz nauk o materiałach. Podjęta problematyka badawcza koncentruje się na nauce o biomateriałach w kontekście medycyny regeneracyjnej kości. Jest to opracowanie nowatorskie o dużym potencjale aplikacyjnym, o czym świadczy uzyskanie patentu, którego współautorką jest Doktorantka. Natomiast o wysokiej wartości naukowej zaprezentowanego dzieła świadczy opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach, których sumaryczny IF wynosi ponad 15. Wszystkie eksperymenty zostały właściwie dobrane, kolejne etapy badań zostały zaplanowane w logiczny sposób oraz wykonane przy użyciu nowoczesnych metod analitycznych. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że uzyskane wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Warto również podkreślić aktywność mgr Katarzyny Szurkowskiej w prezentowaniu wyników badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej na międzynarodowych i krajowych konferencjach, w postaci trzech posterów i dwóch wystąpień ustnych. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Katarzynę Szurkowską rozprawa doktorska spełnia wymagania zapisane w stosownej ustawie, stanowiąc znaczny wkład w dziedzinę nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Biorąc pod uwagę powyższe oraz uwzględniając bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej, jak również rangę rozwiązywanego problemu badawczego, interdyscyplinarność oraz niewątpliwie wyjątkowe walory wdrożeniowe wyników badań, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Szurkowskiej oraz o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. farm. Agata Przekora-Kuśmierz
BIOTECHNOLOG
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Medyczny w Lublinie