

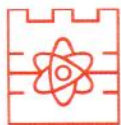
Prof. dr hab. inż. Agnieszka Sobczak-Kupiec
Katedra Inżynierii Materiałowej
Politechnika Krakowska
Al. Jana Pawła II 37
agnieszka.sobczak-kupiec@pk.edu.pl
tel. 12 628 34 48

Kraków, dn. 16.11.2021

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej
pt. „Fosforany wapnia modyfikowane jonami selenu I cynku do potencjalnych
zastosowań w terapii wybranych schorzeń kostnych”**

Recenzja została wykonana na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, prof. dr hab. n. farm. Grzegorza Nałęcz-Jaweckiego o sygnaturze RND/RDNF/5910/712-02/21 z dnia 24.09.2021 r. Rozprawa doktorska mgr farm. Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej została zrealizowana w Katedrze Chemii Analitycznej i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. n. farm. Joanny Kolmas. Praca została zrealizowana dzięki finansowaniu w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki *Sonata Bis 6* (kierownik dr hab. n. farm. Joanna Kolmas) oraz grantu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego *Młody Badacz* (kierownik mgr farm. Aleksandra Laskus-Zakrzewska). Jej zakres wpisuje się w nowoczesną tematykę badań, realizowanych w wiodących ośrodkach naukowych zarówno polskich jak i zagranicznych. W dotychczasowej praktyce chirurgicznej do rekonstrukcji ubytków kości na coraz większą skalę stosuje się fosforany wapnia w tym hydroksyapatyt HA, który pełni rolę substytutu tkanki kostnej. Struktura krystaliczna oraz skład chemiczny hydroksyapatytu są zbliżone do mineralnego składnika kości, z tego względu obserwowane jest stale rosnące zainteresowanie HA, który staje się materiałem stosowanym coraz powszechniej w medycynie, ze szczególnym uwzględnieniem chirurgii kostnej oraz medycyny regeneracyjnej. Hydroksyapatyt wykorzystywany jest w postaci proszku lub pasty czy granul do wypełnienia ubytków kości spowodowanych chorobą bądź nieszczęśliwym wypadkiem, ale także w postaci kształtek ceramicznych lub powłok naniesionych na implanty metaliczne. HA wszczepiony do żywego organizmu wypełnia istniejącą w kości lukę lub tworzy warstwę bioaktywną pomiędzy implantem metalicznym a kością. Bioaktywność hydroksyapatytu polega na tym, że w wyniku działalności komórek kościotwórczych (tj. osteoblastów) na jego

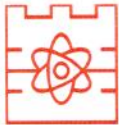


powierzchni dochodzi do narastania nowej naturalnej tkanki kostnej. Metody syntezy hydroksyapatytu są szeroko opisane w literaturze. Metody mokre otrzymywania fosforanów wapnia w tym hydroksyapatytu i bryzytu DCPD umożliwiają wprowadzenie do struktury na drodze substytucji dodatkowych pierwiastków, takich jak potas, sód czy magnez, które występują w naturalnej kości czy w przypadku pracy doktorantki jonów SeO_3^{2-} i Zn^{2+} , które wytypowano ze względu na aktywność osteogenną, antibakteryjną i przeciwnowotworową. Poza stale rosnącym zainteresowaniem obejmującym nowe metody pozyskiwania oraz modyfikacji materiałów ceramicznych przeznaczonych do zastosowań w chirurgii kostnej, uwaga naukowców jest skierowana także na poszukiwanie środków bakteriobójczych o jak najmniejszej szkodliwości dla organizmów żywych, które mogłyby stanowić czynnik modyfikujący materiał ceramiczny. Taka modyfikacja skutkowałaby zwiększeniem jego potencjału aplikacyjnego. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej wpisuje się w tę bardzo aktualną tematykę. Celem jej badań była synteza wybranych fosforanów wapnia CaP (bruszytu i hydroksyapatytu) podstawionych i kopodstawionych jonami cynku i selenu (VI) jak również opracowanie materiałów kompozytowych o charakterze nośnika substancji aktywnej (simwastatyny) zawierających jako fazę ceramiczną zsyntezowane fosforany wapnia zdyspergowane w osnowie zawierającej polimerowy naturalne.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie opracowania, którego integralną część stanowi przedruk pięciu publikacji, w których zawarto rezultaty badań związanych z tematem pracy. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Report JCR i są to: International Journal of Molecular Science 2017 IF 3,687 (P1), International Journal of Molecular Science 2018 IF 4,183 (P2), Ceramics International 2019 IF 3,830 (P3), Ceramics International 2021 IF 4,527 (P4), Materials 2021 IF 3,623 (P5).

Warto podkreślić, że we wszystkich artykułach mgr farm. Aleksandra Laskus-Zakrzewska jest pierwszym autorem. Do dokumentacji dołączono oświadczenia autorów publikacji, wraz ze wskazaniem na czym polegał udział każdego z autorów w przygotowaniu publikacji. W bazie Scopus łączna liczba cytowań publikacji wynosi 37.

Układ rozprawy, na który składa się pięć tematycznie powiązanych publikacji w czasopismach naukowych stanowi ciąg logiczny, w którym podjęto się rozwiązania problemu badawczego na drodze empirycznej. Oprócz wyżej wymienionych przedruków, opracowanie zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów i akronimów, wprowadzenie oraz omówienie materiałów i metod badawczych zastosowanych w realizacji

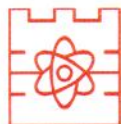


prac badawczych. W trakcie rozdziału 1 czytelnik zostaje wprowadzony w tematykę pracy, zostaje naświetlony problem badawczy i sposób jego rozwiązania. Czytelnik, w prosty sposób może przyswoić specyficzne zagadnienia związane z tematyką pracy. Szeroko zostały opisane zagadnienia dotyczące apatytów biologicznych oraz syntetycznych, jak również właściwości syntetycznych fosforanów wapnia w tym HA oraz DCPD. Cześć literaturową wieńczy przedstawienie zastosowania syntetycznych fosforanów wapnia oraz przykłady ich funkcjonalizacji: łączenie CaP z polimerami (alginian sodu, żelatyna), wprowadzenie jonów obcych do sieci krystalicznej CaP, dodatek substancji leczniczej. Doktorantka przedstawiła materiały i metody zastosowane w pracy oraz uzyskane wyniki wraz z dyskusją. Przed załączonymi tekstami publikacji jest zwięzłe podsumowanie przeprowadzonych badań oraz opis uzyskanych rezultatów oraz wskazaniem elementów nowości naukowej. Całość wieńczy spis cytowanej literatury, spis dodatkowej aktywności Doktorantki oraz wystąpień konferencyjnych związanych bezpośrednio z przedstawionymi badaniami. Opracowanie liczy łącznie 155 stron.

Do dysertacji dołączono również oświadczenia określające precyzyjnie wkład naukowy poszczególnych autorów w publikacje, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej. Wkład Doktorantki w publikacje obejmował: przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji wraz z koncepcją pracy (P1), koncepcję pracy, przegląd literatury, syntezę materiałów, wykonanie badań fizykochemicznych i ich interpretację (P2), koncepcje pracy, syntezę materiałów, analizę fizykochemiczną, interpretację wyników oraz napisanie manuskryptu (P3, P4, P5).

Wkład naukowy w przygotowanie manuskryptów promotora pracy, dr hab. n. farm. Joanna Kolmas obejmował nadzór merytoryczny nad koncepcją pracy oraz recenzję ostatecznej wersji manuskryptu (P1), nadzór merytoryczny nad częścią eksperymentalną i interpretacją wyników (P2, P3, P4, P5).

Znaczący był również wkład dr Anny Zgadzaj z Zakładu Badania Środowiska WUM w publikację nr 2, 3, 4. Polegał on na przeprowadzeniu oceny cytotoksyczności próbek na hodowlach komórkowych oraz ich graficzne przedstawienie (P2, P3, P4). W przygotowaniu ostatniej publikacji z cyklu (P5) brała udział dr n. fam. Paulina Kazimierczak z Katedry i Zakładu Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, której wkład w przygotowanie manuskryptu objął wykonanie analiz cytotoksyczności, interpretację wyników oraz analizę statystyczną.

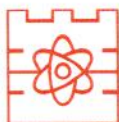


Ze względu na fakt, iż zaprezentowane wyniki zostały już wcześniej poddane krytycznej ocenie recenzentów czasopism o znaczącym współczynniku oddziaływania Impact Factor, w niniejszej recenzji ograniczę się jedynie do krótkiego omówienia przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników.

Cześć eksperymentalną pracy można podzielić na dwa zagadnienia badawcze. Pierwsze z nich dotyczy syntezy oraz charakterystyki materiałów fosforanowo wapniowych – hydroksyapatytu oraz bruszytu substytuowanych jonami SeO_3^{2-} i Zn^{2+} . Doktorantka przeprowadziła szereg syntez CaP monopodstawionych HA (Se-HA oraz Zn-HA), których dokładny opis zawarto w publikacjach P2-P4, za pomocą spektroskopii w podczerwieni potwierdziła efektywne wprowadzenie jonów SeO_3^{2-} do struktury HA. Ponadto, Doktorantka określiła granice, poza którą dochodziło do wyraźnej utraty krystaliczności HA podstawionego jonami Zn^{2+} . Zbadła również wpływ substytucji w HA na stopień krystaliczności oraz morfologię proszków: w przypadku Zn-HA uzyskano kryształy płytkowe, natomiast w przypadku Se-HA wydłużone i igłowe. Ponadto, Doktorantka zaproponowała mechanizmy wbudowywania jonów Zn^{2+} w strukturę HA (P3). W przypadku podstawień jonem selenianowym (IV) jako przyczynę obniżonej krystaliczności materiałów wskazała odmienną orientację przestrzenną jonu SeO_3^{2-} (piramida trygonalna) i ortofosforanowego (tetraedr), co prowadzi do zaburzenia struktury i hamuje wzrost kryształitów. Przeprowadzono również wstępną ocenę zachowania biologicznego zsyntezowanych materiałów. Doktorantka uzyskała również nowe materiały DCPD modyfikowane jonami selenu (IV) do potencjalnych zastosowań jako dokostne pasty implantacyjne stosowane w terapii przeciwnowotworowej (P2-P4).

Drugie zagadnienie badawcze obejmowało opracowanie i charakterystykę materiałów kompozytowych w postaci granul, jako nośnika substancji leczniczej – simwastatyny w dwóch postaciach: niehydrolizowanej oraz hydrolizowanej, co zostało szeroko opisane w publikacji P5. Doktorantka na podstawie wcześniejszych badań jako materiał ceramiczny wytypowała proszki Zn-DCPD oraz Se-HA, natomiast faza polimerowa zawierała alginian sodu oraz żelatynę lub oba polimery. Doktorantka scharakteryzowała właściwości fizykochemiczne układów oraz oznaczyła uwalnianie substancji aktywnej z granul metodą spektroskopową w świetle UV.

Omówione powyżej artykuły zawierają wszystkie szczegółowe informacje dotyczące realizowanych badań oraz zwieńczone są stosownymi wnioskami. Ogólnie praca została przygotowana w sposób jasny, czytelny i przede wszystkim prawidłowy. Nie mam zastrzeżeń

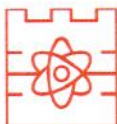


co do sposobu opracowania i przygotowania dysertacji. Strona graficzna jest poprawna. Przedstawione rysunki, wykresy i tabele są czytelne, również strona językowa dysertacji jest poprawna. Po wnikliwym zapoznaniu się z poszczególnymi artykułami w pełni podzielam poglądy zarówno recenzentów jak i edytorów uznających, że przedstawiony materiał jest wartościowy i wnosi wiele istotnych informacji w zakresie układów zawierających fosforany wapnia w aspekcie związanym z możliwością ich wykorzystania jako nośników substancji aktywnych biologicznie. Ogólnie, nie mam zastrzeżeń odnośnie przyjętych metodyk badawczych, sposobu wykonania eksperymentów, przedstawienia i dyskusji uzyskanych wyników. Wyniki badań stanowią dosyć obszerny materiał o charakterze aplikacyjnym i dobrze korelują z założonym celem i koncepcją pracy. Uważam także, że przedstawiony w pracy problem badawczy został sformułowany poprawnie, a postawione cele zostały osiągnięte. Materiał przedstawiony w poszczególnych publikacjach stanowi spójne i ciekawe opracowanie.

W zasadzie nie mam do pracy merytorycznych uwag krytycznych. Chciałabym, aby podczas obrony Doktorantka odniosła się do następujących kwestii:

1. Czy Doktorantka stosowała w swoich badaniach metody planowania eksperymentu?
2. Doktorantka jako granicę utraty krystaliczności wskazała 10% wagowych jonów Zn^{2+} wprowadzonych do struktury HA, natomiast z tabeli na str. 44 dysertacji wynika, że przeprowadzono syntezę dla zawartości 10,30% oraz 6,73%. Na jakiej podstawie doktorantka wskazała właśnie 10%, i skąd pewność, że np. już dla próbki z zawartością domieszki np. 8% nie następuje wyraźna utrata struktury krystalicznej?
3. Doktorantka na stronie 39 pracy wskazała, że po zakończeniu wtłaczania mieszaniny reakcyjnej do roztworu sieciującego granul, pozostałą zawieszinę zważyła w celu obliczenia ilości simwastatyny, która została wprowadzona do granul. Czy Doktorantka oznaczyła faktyczną ilość simwastatyny w granulach metodą bezpośrednią?
4. Czy Doktorantka przemyślała, jaki jest mechanizm uwalniania simwastatyny z granul oraz czy obecność fosforanów wapnia domieszkowanych cykiem i selenem ma wpływ na kinetykę uwalniania substancji aktywnej?
5. Dlaczego zrezygnowano z testów cytotoksyczności dla materiałów w postaci granul i ograniczono się jedynie do testów dla wyjściowych materiałów ceramicznych?

Chciałabym jednak w tym miejscu podkreślić, że wymienione przeze mnie uwagi nie mają wpływu na przyswajanie treści rozprawy, a tym bardziej na wartość merytoryczną pracy. W



podsumowaniu pragnę podkreślić, że sposób zaplanowania badań, forma przedstawienia wyników oraz ich analiza świadczą o bardzo wysokich kompetencjach naukowo-badawczych Doktorantki oraz o właściwym przygotowaniu Jej do pracy naukowej. Prezentowana praca wnosi istotny wkład w badania nad układami zawierającymi fosforany wapnia modyfikowane selenem oraz cynkiem w aspekcie aplikacji jako nośniki substancji aktywnych.

Podjęty w rozprawie problem badawczy jest w pełni trafny i oryginalny, ma znaczenie przede wszystkim praktyczne. Przyjęte przez Doktorantkę cele cząstkowe zostały zrealizowane w sposób poprawny, cel postawiony na wstępie został osiągnięty. Przyjęte metody badawcze oraz forma przedstawienia wyników badań były poprawne. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością wiedzy teoretycznej, metodologii badań oraz metod badawczych a także bardzo dobrym wykorzystaniem źródeł literaturowych. W podsumowaniu charakterystyki ogólnej pracy mgr farm. Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej należy stwierdzić, iż mimo uwag recenzenta posiada ona niezbędne elementy wymagane w rozprawach doktorskich.

Praca spełnia wymagania „Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2014 r. wraz z późniejszymi zmianami i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z prośbą o dopuszczenie pani mgr farm. Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę aktywność naukową Doktorantki, na którą składa się znacząca liczba publikacji z listy JCR, udział w licznych grantach i projektach oraz dojrzałość naukową o czym świadczy sposób napisania rozprawy doktorskiej, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o wyróżnienie.

Z poważaniem,