



Lublin, 10 stycznia 2019 r.

## OCENA

### rozprawy doktorskiej mgr Sylwestra Krukowskiego

#### pt. „Modelowe badania domieszkowanych nanoapatytów wapniowych prostymi związkami organicznymi”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska **mgr Sylwestra Krukowskiego** została wykonana w Katedrze Chemii Analitycznej i Biomateriałów Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. n. farmaceutycznych Wacława Kołodziejkiego. Zespół naukowy pod kierunkiem Pana Profesora Kołodziejkiego od wielu lat z sukcesami zajmuje się badaniami struktury i analizą substancji farmaceutycznych, analizą elementarną syntetycznych i naturalnych materiałów oraz biodegradowalnymi polimerami do zastosowań medycznych i farmaceutycznych. Z zaciekawieniem zapoznałam się więc z obecną dysertacją.

Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyczy domieszkowania hydroksyapatytów wapniowych jonami  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  i  $CO_3^{2-}$  i ich analizy fizykochemicznej oraz modyfikacji wybranego HAP c ytrynianami i aminokwasami kolagenowymi w kontekście potencjalnego zastosowania w medycynie i farmacji. Podstawą rozprawy doktorskiej jest cykl opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych 6 prac o łącznym IF = 10,846 i punktacji MNiSzW = 126, które są dołączone do formy wydruku. Oprócz rezultatów badawczych opublikowanych, dysertacja zawiera także część danych niepublikowanych.

Mimo, iż rozprawę doktorską stanowi głównie cykl publikacji, to Doktorant pokusił się o zamieszczenie w dysertacji szerokiego przeglądu piśmiennictwa dotyczącego kluczowych zagadnień dotyczących tematyki badawczej oraz opisanie części metodycznej i uzyskanych rezultatów. Dysertacja doktorska jest więc obszerna – przedstawiony do recenzji wydruk rozprawy stanowi bowiem 196 stron. Zawiera ona typowy dla rozpraw doktorskich podział na części: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów i akronimów, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Elementy nowości naukowej zawarte w rozprawie, Podsumowanie i Wnioski, Literaturę. Bibliografia obejmuje znaczną



ilość cytowań (151 pozycji) i uwzględnia najnowsze publikacje z obszaru badawczego Doktoranta. Ponadto w dysertacji zawarto opis dodatkowej aktywności naukowej Doktoranta, związanej z pracą doktorską, Oświadczenie autora oraz wydruki artykułów zaliczone do cyklu prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej. Wymagane w tym przypadku oświadczenia współautorów cyklu publikacji, dotyczące indywidualnego wkładu w powstanie prac, nie zostały jednak włączone do formy książkowej dysertacji, tylko występują oddzielnie. Współautorzy publikacji poprzez zadeklarowany procentowy udział w badaniach i tworzeniu manuskryptów potwierdzają w oświadczeniach wiodącą rolę Doktoranta S. Krukowskiego.

**W części wstępnej pracy** Doktorant zamieścił, na podstawie najnowszego piśmiennictwa, treści dotyczące modyfikacji apatytów syntetycznych oraz roli adsorpcji w procesie modyfikacji nanoapatytów. W ramach poruszanego problemu Autor dysertacji przedstawił rezultaty badań spektroskopowych apatytów naturalnych i syntetycznych, modyfikacje hydroksyapatytu jonami, związkami nieorganicznymi i organicznymi w kontekście tworzenia biomateriałów do zastosowań implantologicznych. Duża część wstępu poświęcona jest modyfikacji apatytów cytrynianami i aminokwasami, co korzystnie wpisuje się w nurt zagadnień związanych z częścią badawczą pracy. Ta część dysertacji jest również oparta na opisach zaczerpniętych z publikacji własnych: P1( S. Krukowski, Biuletyn Wydz. Farm. UW, 2013), P2 (M. Karasiewicz, S. Krukowski, Biuletyn Wydz. Farm. UW, 2016), P3 (J. Kolmas, S. Krukowski i wsp. Ceramics Int, 2016). Właściwe dobranie treści we Wstępie pracy ułatwia przejście do części eksperymentalnej pracy. Podsumowując, część przeglądowa dysertacji wskazuje, że Doktorant dysponuje aktualną wiedzą z interesującego Go zakresu badawczego i oceniam to pozytywnie.

W następnej części „Materiały i metody” Doktorant opisał procedury badawcze i warunki doświadczeń, które pod względem merytorycznym nie budzą zastrzeżeń. Badania zostały wykonane z użyciem nowoczesnych technik (transmisyjnego mikroskopu elektronowego, mikroanalizy EDS/EDX, dyfraktometrii, spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego, spektrometrii w podczerwieni, spektrofotometrii). Jednocześnie warto zaznaczyć, że Doktorant przed przystąpieniem do badań adsorpcyjnych prostych związków organicznych opracował własną metodę spektrofotometryczną, pozwalającą na oznaczenia ilościowe adsorbatów, różniącą się od dotychczas stosowanych, brakiem konieczności otrzymywania pochodnych, dających wyraźne pasma adsorpcyjne. Metoda ta została opisana



na przykładzie cytrynianów w publikacji P4 S. Krukowski i wsp. (J. Food and Drug Analysis, 2017, 717-722) i wykorzystana także do oznaczeń aminokwasów (Gly, Pro i HyPro) w środowisku kwaśnym ( $\text{pH} < 1$ ) w UV przy długości fali 202 nm. Ta część pracy jest mocno przekonująca recenzenta, co do wystawienia pozytywnej oceny za część metodyczną pracy, szczególnie w odniesieniu do opracowania oznaczeń aminokwasów, gdyż zwykle do analiz ilościowych aminokwasów wykorzystuje się metodę ninhydrynową w świetle widzialnym.

**Wyniki badań własnych** obejmują otrzymanie hydroksyapatytów domieszkowanych jonami występującymi w naturalnych apatytach tkanki kostnej (HaMg, HaNa, HaMgNa,  $\text{HaCO}_3$ ,  $\text{HaMgNaCO}_3$ ), różniących się właściwościami fizykochemicznymi w zależności od typu domieszkowania. Kolejnym etapem były badania adsorpcji prostych związków organicznych takich jak cytryniany oraz aminokwasy występujące naturalnie w kolagenie (glicyna, prolina, hydroksyprolina), obejmujące analizę połączeń wraz z optymalizacją parametrów takich jak: pH, temperatura i czas. Podejście takie jest ważne w przypadku potencjalnego wykorzystania tworzonych nanomateriałów do wytwarzania połączeń np. z lekami. Doktorant, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazał, że optymalnym pod kątem biomateriałowym, jest hydroksyapatyt domieszkowany łącznie jonami  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , gdyż składem odpowiada tkance kostnej, ale też adsorbuje wszystkie badane związki organiczne ilościowo korzystnie.

Doktorant, poza adsorpcją, podjął też próby wbudowania glicyny w sieć krystaliczną hydroksyapatytu nie modyfikowanego jonami podczas syntezy Ha *de novo*. Wykazał, że glicyna lokalizuje się na powierzchni kryształów, wewnątrz sieci krystalicznej oraz w przestrzeniach agregatowych. Jest to element nowości badawczej, opisany w pracy P6 S. Krukowski i wsp. (J. Solid State Chem. 2018, 264, 59-67), wchodzącej w skład rozprawy. Za pomocą stosownych nowoczesnych technik (FT-IR TRANS i PAS) Doktorant wykazał, że wbudowanie glicyny w sieć krystaliczną Ha skutkuje zmianą parametrów fizykochemicznych. Wymienione tu rezultaty badawcze są godne podkreślenia ze względów aplikacyjnych. Wskazują bowiem na możliwość wytwarzania na bazie hydroksyapatytu biomateriałów kompozytowych, w których drugim składnikiem mogą być niskocząsteczkowe związki organiczne np. niektóre substancje lecznicze.



**Część badawczą pracy doktorskiej** oceniam bardzo dobrze, a uzyskane rezultaty są interesujące aplikacyjnie. Doktorant dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik określił morfologię i rozmiary kryształów, skład pierwiastkowy i wydajność domieszkowania, powierzchnię właściwą uzyskanych przez siebie hydroksyapatytów. Wyróżnić należy umiejętność szczegółowej analizy widm w podczerwieni, co pozwoliło na określenie lokalizacji węglanów w próbkach Ha i zmian ilości grup OH<sup>-</sup> oraz labilnych fosforanów i potwierdzanie uzyskanych zależności techniką spektroskopii MNR. Następnie Autor wykazał, że hydroksyapatyty domieszkowane jonami Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> mogą być skutecznie wykorzystane do adsorpcji cytrynianów, glicyny, proliny i hydroksyproliny. Na podkreślenie zasługuje tu korzystne zastosowanie własnej metodyki oznaczeń ilościowych tych związków oraz dokonanie kompletnej analizy dotyczącej optymalizacji procesu adsorpcji wymienionych związków.

Obszerny materiał eksperymentalny został poddany dyskusji rozprawy doktorskiej, która została przeprowadzona rzetelnie i dojrzałe. Ta część dysertacji świadczy o umiejętności Doktoranta do krytycznego podejścia do własnych rezultatów i porównania ich do wyników dotyczących zakresu tematycznego badań uzyskanych przez innych autorów. Jednocześnie warto zaznaczyć, że Doktorant pokusił się o podsumowanie całości wykonanych badań i sformułowanie wniosków.

**W ocenie ogólnej pracy** niewątpliwie można podkreślić, że praca jest koncepcyjnie interesująca i wykonawczo dobra. Przedstawione do oceny publikacje są spójne tematycznie i prezentują wysoki poziom naukowy. Łączą badania z zakresu inżynierii materiałowej z nowoczesną analizą jakościową i ilościową tworzonych biomateriałów. Efektem przeprowadzonych badań w ramach doktoratu jest wyselekcjonowanie materiałów – wartościowych dla zastosowań biomedycznych. Na podstawie uzyskanych przez Doktoranta rezultatów można będzie prowadzić w przyszłości bardziej zaawansowane prace nad aplikacyjnością hydroksyapatytów domieszkowanych, między innymi przetestowanie ich pod kątem biokompatybilności, zgodności tkankowej, toksyczności, zasiedlania osteoblastów, możliwości osteointegracji i innych cech biologicznych.

Podczas zapoznawania się z pracą doktorską nasunęły mi się też drobne uwagi edytorskie.



Korzystniej byłoby zamieścić w wydruku dysertacji oświadczenia współautorów cyklu publikacji, dotyczące indywidualnego wkładu w powstanie prac, a nie dołączać je oddzielnie.

Uważam, że korzystniej dla czytelnika jest, gdy wykorzystane piśmiennictwo cytowane jest w tekście za pomocą nazwisk autorów, a nie samych numerów przypisanych zgodnie z kolejnością występowania i wtedy w spisie piśmiennictwa prace podawane byłyby w kolejności alfabetycznej wg. nazwiska pierwszego autora. Pod względem edytorskim praca jest przygotowana starannie, choć wkradły się nieliczne błędy stylistyczne i literowe, czy interpunkcyjne.

Wymienione przeze mnie uwagi nie zmieniają mojej bardzo dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr Sylwestra Krukowskiego.

**Podsumowując:** stwierdzam, że Pan mgr Sylwester Krukowski zrealizował postawione cele badawcze, a praca prezentuje dobry poziom naukowy, ma wartości poznawcze i praktyczne. Poddane ocenie rezultaty zawierają istotne elementy nowości naukowej i wpisują się w aktualny nurt badań dotyczących syntezy nowych materiałów do wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Całość dysertacji doktorskiej stanowi więc nowoczesny i oryginalny wkład Doktoranta w rozwój nauk farmaceutycznych i medycznych.

Po analizie dokumentacji z przekonaniem stwierdzam, że **Rozprawa doktorska Pana mgr Sylwestra Krukowskiego spełnia, według mojej opinii, wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r (dz. U. Nr. 65, poz. 595 z 16 kwietnia 2003 r z późniejszymi zmianami) „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i w związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

  
**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Biochemii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
Prof. dr hab. Grażyna Ginalska