



dr hab. Ewa Skwarek prof. UMCS
Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej

Lublin, 10.06.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej
pt.: „Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i
magnezu, jako nośniki raloksyfenu”**

Przedmiot recenzji i ocena formalna rozprawy doktorskiej

W związku z otwartym postępowaniem doktorskim Pani mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej zapoznałam się z kompletem wymaganych dokumentów, zgodnym z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego określonych w art. 13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz.U 2017 r., poz. 1789.

Rozprawa przygotowana pod opieką Pani **dr hab. n. farm. Joanny Kolmas** z **Katedry Chemii Analitycznej i Biomateriałów, w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego** obejmuje 118 stron maszynopisu. Pracę doktorską poświęcono bardzo ważnym badaniom dotyczącym biokompatybilnych materiałów kościozastępczych, składającym się z modyfikowanych jonami magnezu i krzemu fosforanów(V) wapnia, które mogą dostarczać bioaktywne jony i raloksyfen – lek przeciwosteoporotyczny – bezpośrednio do uszkodzonej tkanki kostnej.

Podstawą pracy doktorskiej Pani mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej pt. „**Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i magnezu, jako nośniki raloksyfenu**” są cztery spójnie tematycznie oryginalne artykuły naukowe opublikowane w latach 2017-2021, w tym jedna praca przeglądowa i trzy przedstawiają wyniki badań własnych. Zbiór artykułów naukowych poprzedza 58 - stronicowy *Autoreferat* wprowadzający czytelnika w tematykę badań oraz zwięźle przedstawiający osiągnięcia Doktorantki. Układ pracy jest przejrzysty jest napisana jasnym, komunikatywnym językiem. Praca podzielona jest na 12 rozdziałów. Poza nimi Autorka zamieściła wykaz skrótów i akronimów, streszczenie w języku polskim, abstrakt w języku angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu oraz prezentacji dodatkowej aktywność naukowej związanej z pracą doktorską.

We wstępie mgr farm. Katarzyna Szurkowska przedstawia informacje ogólne na temat fosforanu wapnia, apatytów biologicznych, metod syntezy, podstawień jonowych, materiałów kompozytowych oraz nośników substancji leczniczych. Autorka w małej objętości stron Wstępu zawarła niezbędne informacje do zrozumienia treści pracy. Wybór tematu mgr farm. Katarzyna Szurkowskiej jest dobrze uzasadniony. Zaprezentowany aktualny stan wiedzy został udokumentowany 94 pozycjami literaturowymi, które



cytowane są zgodnie z wymogami, niemal wszystkie są z ostatnich 20 lat. Ponad to na uznanie zasługuje fakt, że cytowane są publikacje Pani promotor. Syntetyczne dane z literatury stanowią dobrze opracowaną podstawę teoretyczną do sformułowania celów rozprawy doktorskiej i wyboru metod badawczych dla ich realizacji.

W dalszej części zaprezentowano cele pracy, sposób ich osiągnięcia przez wykorzystanie odpowiednich materiałów i metod, omówiono wyniki badań, bardzo interesująco przedstawiono aspekt nowości naukowej, podsumowanie, wnioski oraz bibliografię.

W mojej opinii *Autoreferat* jest przejrzysty, zawarte w nim są najistotniejsze zagadnienia i związane z analizowanym tematem. Ich zestawienie utwierdza czytelnika w przekonaniu, że Doktorantka potrafi krytycznie analizować literaturę przedmiotu i dobrać te informacje, które są istotne z punktu widzenia uzyskanych wyników. W celu fizykochemicznej charakteryzacji badanych materiałów posłużono się wieloma, dobrze dobranymi, najnowszymi metodami instrumentalnymi, co zasługuje na jak najwyższą ocenę.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

W pierwszej publikacji Autorka opisała hydroksyapatyt (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), który odgrywa kluczową rolę w implantologii i stomatologii. Ze względu na duże podobieństwo do nieorganicznej frakcji zmineralizowanych tkanek (kości, szkliwo i zębiny), jest stosowany, jako składnik wielu substytutów kości, powłok implantów metalowych i materiałów stomatologicznych. Inżynieria biomateriałów często wykorzystuje zdolność HA do częściowej substytucji jonów, ponieważ włączenie różnych jonów do struktury HA prowadzi do uzyskania materiałów o ulepszonych właściwościach biologicznych i fizykochemicznych. Celem pracy było przedstawienie przeglądu aktualnej wiedzy na temat apatytów, w których odpowiednie miejsca zastąpiono jonami krzemu. Chociaż dokładny mechanizm działania krzemu w tworzeniu kości nie został w pełni wyjaśniony, badania wykazały korzystny wpływ tego pierwiastka na mineralizację kości oraz syntezę i stabilizację kolagenu typu I. Artykuł opisuje funkcje krzemu w tkance kostnej i przedstawia aktualny stan badań nad syntetycznym HA zawierającym jony krzemianowe (Si-HA). Omówiono również zastosowanie HA modyfikowanego jonami krzemu.

W drugiej publikacji Doktorantka przedstawiała już wyniki własnych badań dotyczących czystego hydroksyapatytu (HA), HA wzbogaconego jonami Mg^{2+} (Mg-HA) i SiO_4^{4-} (Si-HA), a także próbki (MgSi-HA), zsyntetyzowanej metodą strącania i scharakteryzowanych różnymi metodami analitycznymi. Stopień podstawienia badano metodą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES). Strukturę chemiczną próbek określono za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) i magnetycznym rezonansem jądrowym ciała stałego (^{29}Si -NMR). Proszkową dyfrakcję rentgenowską (PXRD) zastosowano do identyfikacji faz i scharakteryzowania parametrów komórek elementarnych. Ocenę morfologii kryształów przeprowadzono za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM).



Wszystkie próbki okazały się być cytokompatybilne, co potwierdziły testy in vitro na linii komórkowej fibroblastów BALB/c 3T3. Ponadto próbka MgSi-HA została wykorzystana do przygotowania granulatu na bazie alginianu sodu i siarczanu chondroityny. Opracowano nową metodę sieciowania za pomocą jonów Mg^{2+} . Otrzymane niskoporowate granulki scharakteryzowano następnie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

W kolejnej publikacji Autorka doktoratu przedstawiała wyniki dotyczące innego rodzaju fosforanu(V) wapnia: proszki -TCP zawierające różne ilości krzemu, które zostały zsyntetyzowane stosując dwie różne metody: wytrącanie chemiczne na mokro i syntezę w stanie stałym. Otrzymane proszki zostały następnie poddane badaniom fizykochemicznym różnymi metodami: skaningową i transmisyjną mikroskopią elektronową (TEM i SEM), spektroskopią rentgenowską z dyspersją energii (EDS), proszkową dyfraktometrią rentgenowską (PXRD), spektroskopią w podczerwieni i ramanowską oraz magnetycznym rezonansem jądrowym ciała stałego (ssNMR). Badania wykazały, że sposób syntezy wpływa na morfologię otrzymanych cząstek, jednorodność fazy krystalicznej i skuteczność podstawienia Si. Proszki otrzymane tą metodą w stanie stałym są mniej jednorodne i zawierają znaczną ilość innej fazy krystalicznej, silicocarnotite (do 7,33%). Ponadto mikrokryształy otrzymane tą metodą mają bardziej nieuporządkowaną strukturę. Może to być spowodowane efektywniejszą substytucją jonów krzemianowych: zawartość krzemu w próbkach otrzymanych metodą spiekania ciała stałego jest prawie równa wartości nominalnej.

W ostatniej publikacji zaprezentowano badania o dużym potencjale aplikacyjnym. Osteoporoza jest ogólnosiątkową chorobą przewlekłą charakteryzującą się zwiększoną łamliwością kości i prawdopodobieństwem złamania. W leczeniu ubytków kości są stosowane materiały na bazie fosforanów wapnia (CaPs), ze względu na ich duże podobieństwo do minerału kostnego, ich nietoksyczność i zwiększenie właściwości osteogennych. Ponadto CaPs, zwłaszcza hydroksyapatyt (HA), może być z powodzeniem używany, jako nośnik do lokalnego dostarczania leków. Celem tej pracy było: wytworzenie kulek kompozytowych na bazie hydroksyapatytu do potencjalnego zastosowania, jako miejscowych nośników raloksyfenu. Proszek HA modyfikowany jonami magnezu i krzemu (Mg, Si-HA) (oba pełnią korzystne role w tworzeniu kości), wykorzystano do przygotowania kulek kompozytowych. Jako matrycę organiczną zastosowano alginian sodu z siarczanem chondroityny i/lub keratyną. Sieciowanie kulek zawierających chlorowodorek raloksyfenu (RAL) przeprowadzono z jonami Mg w celu dodatkowego zwiększenia stężenia tego pierwiastka na powierzchni materiału. Morfologię i porowatość trzech różnych rodzajów ciała stałego otrzymanych w pracy scharakteryzowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) oraz porozymetrii. Mg i Si uwolnione z proszku Mg, Si-HA mierzono za pomocą optycznej spektrometrii emisyjnej z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-OES). Profile uwalniania RAL in vitro badano przez 12 tygodni za pomocą spektroskopii UV/Vis. Granule poddano również testom biologicznym in vitro na liniach komórkowych osteoblastów i kostniakomięsaka. Wszystkie otrzymane materiały miały kulisty kształt o chropowatej, porowatej powierzchni. Produkt otrzymany z siarczanu



chondroityny i keratyny (CS/KER-RAL) wykazywał najniższą porowatość, co skutkowało najwyższą odpornością na zgniatanie. Wyniki wykazały, że właśnie te kompozyty charakteryzują się najbardziej przedłużonym uwalnianiem leku. Na podstawie wyników udało się dobrać optymalny skład mieszaniny siarczanu chondroityny i keratyny.

Wyniki pracy doktorskiej i ich znaczenie

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera wiele nowych i interesujących wyników, szczególnie istotnych z punktu widzenia praktyki farmaceutycznej i chemicznej. Dlatego temat rozprawy uważam za bardzo ważny, zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia, a uzyskane wyniki za oryginalne i interesujące. Rozprawa jest spójna, przemyślana pod względem eksperymentatorskim, dostarcza nowych i istotnych danych. Zarówno staranność edytorska, jak i poprawność językowa budzą uznanie. Doktorantka zadbała o przejrzystość i jasność opisów. Merytoryczną wartość rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej oceniam bardzo dobrze. Układ rozprawy doktorskiej jest przejrzysty, a dyskusja rzeczowa.

Za najcenniejsze i najważniejsze osiągnięcia Doktorantki w ramach przeprowadzonych badań uważam:

1. Otrzymanie szeregu fosforanów wapnia podstawionych jonami magnezu i krzemu. Materiały wykazywały zmienne właściwości fizykochemiczne w zależności od składu fazowego, wybranej metody syntezy czy zastosowanych odczynników. Żadna z próbek nie wykazywała efektu cytotoksycznego, co potwierdziły testy *in vitro* przeprowadzone na linii komórkowej mysich fibroblastów.
2. Na podstawie próbki hydroksyapatytu kosubstituowanego Mg i Si opracowanie metody otrzymywania granul kompozytowych na bazie alginianu sodu i siarczanu chondroityny. Opracowała również nową metodę sieciowania granul alginianowych jonami Mg^{2+} , co pozwoliło na zwiększenie zawartości magnezu w próbce i spowodowało przyspieszenie uwalniania jonów Mg^{2+} do medium.
3. Przeprowadzenie modyfikacji składu granul alginianowych, stosując, jako dodatek biopolimerowy siarczany chondroityny, keratynę oraz mieszaninę tych dwóch składników. Mgr farm. Katarzyna Szurkowska przygotowała trzy serie granul zawierających lek antyresorpcyjny – raloksyfen. Przeprowadziła badania uwalniania substancji leczniczej *in vitro* i porównała profil uwalniania leku z każdego typu granul. Skład granul jednoznacznie wpływał na uwalnianie RAL. Lek był uwalniany stopniowo wraz z powolnym pęcznieniem i degradacją granul, po 12 tygodniach inkubacji ilość uwolnionego leku wynosiła od 33% do 60%.
4. Porównanie aktywności biologicznej *in vitro* na podstawie testu MTT przeprowadzonego na linii komórkowej ludzkich osteoblastów i komórkach nowotworowych kostniakomięsaka. Otrzymane rezultaty wykazują szczególnie korzystne działanie biologiczne granul serii CS-RAL oraz CS/KER-RAL, które są



biokompatybilne względem osteoblastów, równocześnie redukując żywotność komórek kostniakomięsaka.

5. Porównując otrzymane wyniki można pokusić się o stwierdzenie, że Doktorantka z powodzeniem otrzymała materiały kompozytowe w formie granul zawierających wybraną substancję leczniczą. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej, w dalszej perspektywie, mogą przyczynić się do rozwoju badań aplikacyjnych nad nowymi biomateriałami kostnymi. Lokalne dostarczanie raloksyfenu bezpośrednio do tkanki kostnej może zwiększyć znaczenie tego leku w praktyce klinicznej, pozwalając na osiągnięcie pożądanej efektywności terapii przy równoczesnej redukcji ogólnoustrojowych działań niepożądanych.

Oceniając cel i zakres pracy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej należy podkreślić nowatorstwo proponowanych procedur syntezy materiałów oraz ogrom pracy, jaka została wykonana dla pełnej charakterystyki właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów.

Podsumowując tę część chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę badania wymagały specjalistycznej i szerokiej wiedzy. Autorce udało się zakończyć badania niewątpliwymi osiągnięciami. Świadczy to o bardzo dobrych podstawach naukowych, wszechstronności i nowoczesności podejścia do postawionego problemu naukowego.

W trakcie lektury nasuwają się jednak pewne pytania i na tym etapie oceny chciałabym poprosić o dyskusję w następującym zakresie tematycznym:

1. Jaki był stopień czystości odczynników chemicznych użytych do syntez, to może mieć znaczenie w procesie osadzania leku?
2. Jak Pani ocenia wydajność syntez, które Pani przeprowadziła?
3. Jak wiadomo kompatybilność wielkości porów w kości (100-300 μm) i materiałach syntezowanych jest bardzo ważna ze względu na właściwości osteogenne, umożliwiając one adhezję i migrację komórek kościotwórczych, integrację z tkanką gospodarza oraz odpowiednie unaczynienie. Czy Doktorantka ma jakiś pomysł, jak zwiększyć wielkość porów w otrzymywanych przez nią materiałach?
4. Po procesie syntezy przemywano osady tak by pH przesączu wynosiło ok. 7. To dobra metoda, ale warto byłoby ocenić przewodnictwo właściwe.
5. Autorka potwierdziła strukturę porowatą granul za pomocą obrazowania SEM to bardzo dobra metoda, a publikacji P2 jest podana powierzchnia właściwa. Sugerowałabym na przyszłość rozszerzyć badania o metodę ASAP (niskotemperaturową adsorpcję/desorpcję azotu), która to dostarczy dodatkowych danych na temat wielu parametrów teksturalnych powierzchni.
6. Z powodzeniem można stwierdzić, że otrzymane przez Doktorantkę materiały kompozytowe w formie granul zawierających wybraną substancję leczniczą, w dalszej perspektywie mogą przyczynić się do rozwoju badań aplikacyjnych nad nowymi biomateriałami kostnymi. Lokalne dostarczanie raloksyfenu bezpośrednio do tkanki kostnej może zwiększyć znaczenie tego leku w praktyce klinicznej i osiągnięcie pożądanej efektywności terapii przy równoczesnej redukcji



ogólnoustrojowych działań niepożądanych. W związku z tym, jakie badania biologiczne i kliniczne można jeszcze zaproponować, aby możliwe stało się wykorzystanie ich w praktyce leczenia schorzeń kości?

Wymienione powyżej uwagi mają formę sugestii lub mogą stanowić początek dyskusji w trakcie obrony pracy doktorskiej. Zwyczajowym elementem recenzji rozpraw doktorskich jest również wskazanie drobnych uchybień czy potknięć językowych związanych najczęściej z żargonem, interpunkcją itp. Przykładowe z nich to:

1. str. 19 – reakcje 1 nie są zbilansowane,
str. 23 - reakcja 4 nie jest zbilansowana,
str. 24 - reakcja 5 nie jest zbilansowana,
str. 45 - reakcja 6 nie jest zbilansowana;

2. Tabela 1 s. 14 błąd w nazwie polskiej DCPD

3. str. 30 Zdanie „Zwiększona oczekiwana długość życia w krajach rozwiniętych doprowadziła do poważnego wzrostu liczby schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego, takich jak osteoporoza i choroba zwyrodnieniowa stawów chyba powinno być: *Zwiększona średnia długość.....*

Zauważone błędy czy wymienione nieścisłości w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej.

Tym bardziej, że jak już wspominałam wcześniej, w rozprawie umieszczony został dorobek naukowy Doktorantki w formie spisu publikacji naukowych, który obejmuje 4 publikacje o średnim Imapct Factor przypadającym na publikację równymi 3,78, a **sumaryczny wynosi 15,134, co daje 350 pkt MEiN**; w tym bardzo wartościową pracę przeglądową (wg. bazy Web of Science 31 cytowań (8.06.2021), które mogą z dużym prawdopodobieństwem w niedalekim czasie znacznie wzrosnąć). Dodatkowym atutem pracy jest to, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem i według oświadczeń ma większościowy udział (70% i więcej) we wszystkich pracach naukowych objętych rozprawą pracą doktorską. Bardzo ważnym osiągnięciem według mnie jest również uzyskanie patentu (nr 234312 (28.02.2020) – J. Kolmas, **K. Szurkowska**, Ł. Pajchel pt.: *Sposób otrzymywania mikrokrystalicznego modyfikowanego hydroksyapatytu*, bardzo rzadki w pracach doktorskich. Mgr farm. Katarzyna Szurkowska przedstawiła szereg wygłoszonych komunikatów i posterów na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Powyższa aktywność naukowa świadczy o tym, że uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki zostały już opracowane, zrecenzowane i opublikowane.

Ponadto ważnym osiągnięciem Doktorantki było wykonanie grantu Sonata Bis 6, w ramach, którego zbadała fosforany wapnia podstawione jonami fluoru, strontu, boru oraz galu, W latach 2018-2019 była również kierownikiem grantu Młodego Badacza, podczas którego skupiła się na biomateriałach wzbogaconych w jony galu i strontu. Poza tym dwukrotnie uzyskała nagrodę indywidualną Rektora WUM.

Wiosek końcowy



Podsumowując przedstawioną do recenzji pracę doktorską Pani mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej pt.: **Kompozyty zawierające fosforany wapnia wzbogacone w jony krzemu i magnezu, jako nośniki raloksyfenu** uważam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego określonych w art. 13 ust.1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz. U 2017 r., poz. 1789.

Podjęta przez doktorantkę tematyka badań jest bardzo wartościowa, ma liczne walory innowacyjne oraz aspekt praktyczny. Z całkowitym przekonaniem przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr farm. Katarzyny Szurkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wyjątkowy walor poznawczy przedłożonej do oceny pracy doktorskiej oraz jej duży aspekt praktyczny, stawiam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o jej **wyróżnienie**.

Lublin, 09.06.2021

Ewa Skwarek

