



22.10.2021 r.

Dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz, prof. UM
Samodzielna Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej pt. „Fosforany wapnia modyfikowane jonami selenu i cynku do potencjalnych zastosowań w terapii wybranych schorzeń kostnych” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Joanny Kolmas w Katedrze Chemii Analitycznej i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi cykl pięciu publikacji zebranych pod wspólnym tytułem „Fosforany wapnia modyfikowane jonami selenu i cynku do potencjalnych zastosowań w terapii wybranych schorzeń kostnych”. Na cykl artykułów składa się 1 praca przeglądowa oraz 4 prace oryginalne. Trzy artykuły badawcze dotyczą syntezy fosforanów-wapnia (HA oraz DCPD) podstawionych jonami selenu lub cynku, natomiast czwarty artykuł skupia się na syntezie kompozytowych granul na bazie opracowanych wcześniej fosforanów-wapnia oraz naturalnych polimerów (alginianu i żelatyny). Przedstawione artykuły badawcze prezentują pełną charakterystykę fizykochemiczną opracowanych biomateriałów oraz podstawowe testy biologiczne z wykorzystaniem hodowli komórek eukariotycznych w warunkach *in vitro*. Wszystkie wskazane prace zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej w latach 2017-2021, a ich sumaryczny współczynnik Impact Factor (IF) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 19,85. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka jest pierwszym autorem w każdym z tych artykułów.

Temat podjęty przez Doktorantkę wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu inżynierii biomateriałów oraz medycyny regeneracyjnej. W ramach prowadzonych badań, Doktorantka opracowała hydroksyapatyt oraz bruszyt podstawione jonami cynku lub/i selenu do zastosowań w leczeniu różnego rodzaju schorzeń kostnych. Opracowane fosforany wapnia zostały następnie wykorzystane do syntezy kompozytowych granul, służących jako nośniki simwastatyny, a więc leku znanego ze swojego pozytywnego wpływu na proces kościotworzenia.



Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Praca jest przejrzysta, a cele badawcze zostały bardzo dobrze sformułowane. Obejmuje ona spis treści, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów i akronimów oraz dość szczegółowy opis osiągnięcia naukowego z podziałem na: Wstęp, Cele, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusja oraz Podsumowanie i Najważniejsze Wnioski. Oryginalne artykuły wchodzące w skład cyklu obejmują 3 powiązane ze sobą cele badawcze: (1) syntezę bruszytu (DCPD) podstawionego jonami cynku lub/i selenu, (2) syntezę hydroksyapatytu (HA) domieszkowanego jonami cynku lub/i selenu oraz (3) syntezę kompozytowych granул na bazie opracowanej wcześniej bioceramiki (HA oraz DCPD).

Pierwszy artykuł (P1) z cyklu jest to praca przeglądowa opisująca możliwe modyfikacje ceramiki fosforanowo-wapniowej za pomocą różnych jonów. Artykuł ten stanowi bardzo wartościowy wstęp do tematyki podjętej przez Doktorantkę w ramach badań doktorskich. Niemniej jednak ww. pracy Doktorantka skupiła się analizie ceramiki domieszkowanej jonami cynku, krzemu, magnezu, strontu, z pominięciem selenu, którego dotyczy rozprawa doktorska, co jest drobnym niedociągnięciem. Artykuł drugi (P2) oraz czwarty (P4) przedstawiają syntezę bruszytu wzbogaconego w jony selenu oraz cynku wraz z jego pełną charakterystyką fizykochemiczną (FTIR, NMR, ICP-OES, SEM) oraz oceną cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych zgodnie z normą ISO 10993-5. W ramach pracy P2 Doktorantka zsyntetyzowała bruszyt domieszkowany jonami selenu. Wybór tego rodzaju modyfikacji bruszytu, Doktorantka uzasadniała aktywnością przeciwnowotworową selenu. Niemniej jednak w artykule P2 brakuje podstawowego testu toksyczności wobec komórek nowotworowych, potwierdzającego tę hipotezę. Ponadto bruszyt wzbogacony w jony selenu wykazał bardzo silną toksyczność wobec komórek eukariotycznych (0% żywotność dla 100% ekstraktu), wskazując na brak potencjału tego biomateriału w zastosowaniach biomedycznych. Artykuł P4 przedstawia syntezę oraz charakterystykę bruszytu domieszkowanego jonami cynku. W tym przypadku Doktorantce udało się zsyntetyzować nietoksyczne materiały o dużym potencjale w zastosowaniach biomedycznych. W tym miejscu jako Recenzent czuję się zobligowana zwrócić uwagę na sposób przedstawienia wyników badań biologicznych. Zarówno artykuł P2, jak i P4 przedstawiają wyniki testu toksyczności bez analizy statystycznej oraz odchyłeń standardowych. W metodyce brakuje również informacji w ilu powtórzeniach został wykonany eksperyment oraz w jaki sposób wyliczono wartość IC_{50} . Ponadto dobrym uzupełnieniem artykułu P4,



byłaby ocena profilu uwalniania jonów Zn z bioceramiki – analogiczna jaką Doktorantka wykonała w ramach artykułu P3.

Drugi cel badawczy pracy doktorskiej skupia się na syntezie hydroksyapatytu z podstawionymi jonami cynku lub/i selenu. Artykuł P3 analogicznie jak poprzednie prace badawcze przedstawia syntezę oraz pełną charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych biomateriałów (TEM, PXRD, FTIR, NMR, ICP-OES). Ponadto Doktorantka dokonała oceny profilu uwalniania jonów cynku i selenu z otrzymanej bioceramiki oraz wykonała test cytotoksyczności w warunkach *in vitro*. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka wyciągnęła wniosek, że wszystkie próbki zawierające w swoim składzie selen są toksyczne. Jedynie ceramika domieszkowana jonami cynku jest w pełni cytokompatybilna, ponieważ nie zmienia morfologii mysich fibroblastów. W tym miejscu chciałabym zwrócić Doktorantce uwagę, że przeprowadzony przez nią test wg normy ISO 10993-5 dał jedynie informację o toksyczności materiałów. Cytokompatybilność jest bardzo szerokim pojęciem i żeby to udowodnić, Doktorantka musiałaby wykonać szereg innych eksperymentów, np. test aktywności metabolicznej komórek, test proliferacji, test adhezji komórek do powierzchni próbek wraz z oceną morfologii komórek na powierzchni biomateriału. W artykule P3 wkradł się również błąd w opisie metodyki, gdzie Doktorantka nazywa kontrolą pozytywną polietylen, natomiast negatywną lateks – powinno być na odwrót. Jest to z pewnością błąd edytorski, ponieważ w opisie wyników Doktorantka posługuje się już prawidłowym nazewnictwem. Niemniej jednak jako Recenzent czuję się w obowiązku zwrócić uwagę również na takie edytorskie niedopatrzanie.

Artykuł P5 jest poniekąd uwieńczeniem wszystkich badań. W ramach pracy P5 Doktorantka wykorzystwała wytworzoną wcześniej bioceramikę do produkcji granul kompozytowych na bazie alginianu i żelatyny. Ponadto zsyntetyzowane granule były dodatkowo wzbogacone w simwastatynę, znaną ze swojego pozytywnego wpływu na proces kościotworzenia, służąc jako nośniki leków. Do syntezy granul Doktorantka wykorzystwała hydroksyapatyt domieszkowany jonami selenu oraz bruszyt wzbogacony w jony cynku. Zsyntetyzowana ceramika została poddana analizie fizykochemicznej (PXRD, ICP-OES, FTIR) oraz ocenie cytotoksyczności wobec ludzkich prawidłowych osteoblastów oraz komórek nowotworowych (kostniakomięsaka). Wyniki testu cytotoksyczności są bardzo obiecujące, ponieważ wykazują brak toksyczności bioceramiki zawierającej selen wobec komórek prawidłowych (żywołność ok. 90%) oraz jej znaczną toksyczność wobec komórek nowotworowych (żywołność < 30%). W następnym etapie Doktorantka wytworzyła



kompozytowe granule na bazie bioceramiki, oceniła ich porowatość oraz dokonała oceny profilu uwalniania simwastatyny z granul. W tym miejscu dostrzegam pewien brak logiki w planowaniu eksperymentów. Skoro nadrzędnym celem artykułu P5 była synteza kompozytowych granul wzbogaconych w simwastatynę, to dlaczego Doktorantka przeprowadziła test cytotoksyczności na proszkach hydroksyapatytu i bruszytu, a nie na finalnym biomateriale, czyli granulach? Zarówno użyte polimery, metoda syntezy granul, jak i simwastatyna mogą mieć ogromny wpływ na żywotność komórek. Odnoszę wrażenie, że przeprowadzony test cytotoksyczności powinien być raczej częścią artykułu P3 oraz P4, w których Doktorantka dokonała charakterystyki odpowiednio proszku hydroksyapatytowego wzbogaconego w jony selenu oraz bruszytu domieszkowanego jonami cynku.

W ramach przedstawionego cyklu artykułów Doktorantka zrealizowała w pełni założone cele badawcze przy użyciu bogatej metodyki z zakresu analizy fizykochemicznej biomateriałów. Praca doktorska przedstawia również podstawowe, ale bardzo ważne z punktu widzenia certyfikacji wyrobów medycznych, badania biologiczne *in vitro* wg normy ISO 10993-5. Niemniej jednak jako Biotechnolog oraz ekspert z zakresu wykorzystywania modeli komórkowych do charakterystyki biologicznej biomateriałów, czuję pewien niedosyt jeśli chodzi o ocenę właściwości biologicznych biomateriałów. Bardzo wartościowym dodatkiem do artykułów P2 oraz P3 byłaby ocena aktywności przeciwnowotworowej bioceramiki wzbogaconej w jony selenu. Natomiast wartościowym uzupełnieniem pracy P3 oraz P4 byłaby ocena aktywności przeciwbakteryjnej materiałów zawierających w swoim składzie jony cynku. Ponadto zarówno cynk, jak i simwastatyna mogą pozytywnie wpływać na proces kościotworzenia, dlatego analiza wpływu uwolnionych z bioceramiki/granul jonów cynku oraz simwastatyny na proces różnicowania osteogennego byłaby cennym dodatkiem do pracy doktorskiej. Niemniej jednak nie jest to uwaga, a raczej drobna sugestia dotycząca przyszłych kierunków badawczych. Jakość i obiektywizm zastosowanych metod nie budzi żadnych zastrzeżeń, a praca doktorska bez wątplenia prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Co ważne badania biologiczne z wykorzystaniem hodowli komórek *in vitro* zostały wykonane we współpracy naukowej z innymi jednostkami, co wskazuje na interdyscyplinarność prowadzonych badań i świadczy o umiejętności nawiązywania kontaktu i otwartości Doktorantki na współpracę naukową.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej pt. „Fosforany wapnia modyfikowane jonami selenu i cynku do potencjalnych zastosowań w terapii wybranych schorzeń kostnych” przedstawiona jako cykl powiązanych tematycznie



publikacji jest bardzo wartościowym dziełem z zakresu nauk farmaceutycznych oraz nauk o materiałach. Podjęta problematyka badawcza koncentruje się na wytworzeniu zmodyfikowanej bioceramiki do zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości. O wysokiej wartości naukowej zaprezentowanego dzieła świadczy opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach, których sumaryczny IF wynosi prawie 20. W ramach pracy doktorskiej mgr Aleksandra Laskus-Zakrzewska zastosowała właściwie metody badawcze, a eksperymenty zostały 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 naukową mgr Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej, która pełniła rolę kierownika w projekcie finansowanym ze źródeł wewnętrznych oraz była wykonawcą w projekcie Sonata Bis, którego kierownikiem była prof. dr hab. Joanna Kolmas. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Aleksandrę Laskus-Zakrzewską 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 merytoryczną rozprawy doktorskiej, jak również rangę rozwiązywanego problemu badawczego oraz interdyscyplinarny charakter badań, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Laskus-Zakrzewskiej oraz o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
A. Przekora - Kusmierz
dr hab. Agata Przekora-Kusmierz, prof. UM

