



02.02.2024 r.

Prof. dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz
Zakład Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Dział Obsługi Rady ds. Nauki i Doktorantów
WPŁYNEŁO

02. 02. 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Kołodziejkiej

pt. „Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćcozastępczy” wykonanej
pod kierunkiem dr hab. Joanny Kolmas w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej
i Biomateriałów Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „*Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćcozastępczy*” dotyczy opracowania metody wytwarzania wielofunkcyjnych biomimetycznych kompozytów apatytowo-kolagenowych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości. Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech opublikowanych artykułów o sumarycznym współczynniku IF (zgodnie z rokiem opublikowania) równym 12,223, na który składa się 1 praca przeglądowa oraz 2 prace oryginalne. Do cyklu Doktorantka załączyła również 1 pracę oryginalną, która na etapie wszczęcia postępowania o nadanie stopnia doktora była w recenzji, natomiast 25 listopada 2023 roku została opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Wliczając tę pracę jako czwartą do cyklu, sumaryczny IF wszystkich artykułów wynosi 17,823. Wszystkie wskazane w cyklu artykuły zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej w latach 2020-2023, Doktorantka jest pierwszym autorem w każdej pracy, a przedstawione oświadczenia o indywidualnym wkładzie w powstanie tych artykułów jednoznacznie wskazują na wiodący udział Doktorantki (we wszystkich publikacjach jest to 60%). Do cyklu artykułów stanowiącego podstawę do nadania stopnia doktora mgr Barbara Kołodziejka dołączyła autoreferat, który stanowi krótkie podsumowanie wszystkich badań. Autoreferat składa się z typowych dla pracy badawczej rozdziałów, tj. Wstępu, Celu pracy, Materiałów i metod, Podsumowania i wniosków oraz Bibliografii. Praca doktorska uzupełniona jest o wykaz stosowanych skrótów i akronimów, rozdział podkreślający aspekty nowości w pracy oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, co jest wymagane stosowną ustawą.



W ramach prowadzonych badań Doktorantka podjęła bardzo ważny temat naukowy związany z opracowaniem biomateriałów kościozastępczych o cechach mikrostrukturalnych oraz fizykochemicznych imitujących ludzką kość. Dodatkowo opracowane przez Doktorantkę biomateriały zostały wzbogacone w różne substancje bioaktywne, dzięki czemu mogłyby znaleźć zastosowanie również jako nośniki leków. Pierwszy artykuł (P1) z cyklu jest to praca przeglądowa opisująca różne metody syntezy kompozytów kolagenowo-apatytowych oraz podstawowe właściwości biologiczne tego typu biomateriałów pod kątem ich zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości. Artykuł ten stanowi bardzo dobre wprowadzenie w problem badawczy podjęty przez Doktorantkę. W ramach badań doktorskich, mgr Barbara Kołodziejska zoptymalizowała proces syntezy biomimetycznego nanokrystalicznego apatytu (artykuł P2), który następnie posłużył jej do produkcji 2 typów biomateriałów polimerowo-ceramicznych do zastosowań w medycynie regeneracyjnej kości: (1) biomimetycznego kompozytu kolagenowo-apatytowego, w tym wariantu wzbogaconego w kwas traneksamowy (artykuł P3) oraz (2) biomimetycznych granul kolagenowo-alginianowo-apatytowych wzbogaconych w ibuprofen, w tym wariantów z domieszką chitozanu i serycyny (artykuł P4). Wszystkie wytworzone biomateriały zostały poddane podstawowym analizom fizykochemicznym (m.in. analiza FT-IR, ICP-OES, PXRD) oraz mikrostrukturalnym (m.in. TEM, SEM). Ponadto Doktorantka dokonała oceny cytotoksyczności *in vitro* biomateriałów wg normy dla wyrobów medycznych (ISO 10993-5) oraz oceniła profil uwalniania substancji leczniczych oraz jonów cynku i magnezu. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania skutkowały otrzymaniem obiecujących biomateriałów do zastosowań w regeneracji tkanki kostnej w formie porowatych kształtek kompozytowych na bazie biomimetycznego proszku apatytowego oraz dwóch rodzajów kolagenu, jak również w formie granul z dodatkiem innych biopolimerów: alginianu, serycyny oraz chitozanu. Opracowane kształtki kompozytowe nie tylko imitują budowę tkanki kostnej, ale także dzięki obecności kwasu traneksamowego powinny wykazywać właściwości hemostatyczne. Z kolei opracowany granulat kompozytowy wykazuje korzystny profil uwalniania ibuprofenu, tym samym będąc obiecującym biomateriałem o właściwościach przeciwzapalnych do zastosowań w chirurgii stomatologicznej.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Kołodziejskiej przedstawiona w formie autoreferatu oraz cyklu powiązanych tematycznie artykułów została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i graficznym. Praca jest przejrzysta, a cele badawcze zostały bardzo dobrze sformułowane. Doktorantka w sposób prawidłowy zaplanowała wszystkie eksperymenty oraz zastosowała właściwe metody badawcze w celu oceny podstawowych



właściwości fizykochemicznych, mikrostrukturalnych oraz biologicznych opracowanych biomateriałów. Dobór jak i jakość zastosowanych metod badawczych nie budzi żadnych zastrzeżeń, a praca doktorska bez wątpienia prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Na pochwałę zasługuje bardzo przemyślane podejście do podjętego przez Doktorantkę tematu. W pierwszym etapie badań mgr Barbara Kołodziejaska zoptymalizowała sposób otrzymywania biomimetycznego apatytu, który następnie posłużył jej do produkcji 2 typów obiecujących biomateriałów do regeneracji kości.

Jako Recenzentka jestem także zobligowana przedstawić główne niedociągnięcia oraz uwagi do pracy doktorskiej. Dlatego w tym miejscu chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań oraz ustosunkowanie się do pewnych uwag:

- (1) Autoreferat – opis do Rysunku 11: w tytule Rys. 11. jest sformułowanie „*Komórki MG-63 na powierzchni wybranych materiałów po 7 dniach inkubacji, wybarwione techniką MTT (...)*”. Metoda MTT nie służy do barwienia komórek tylko do oceny ich aktywności metabolicznej, a tym samym żywotności. Faktycznie, wytworzone wewnątrzkomórkowo fioletowo-granatowe kryształy formazanu mogą dać efekt wybarwienia komórek, ale zwrot „*wybarwione techniką MTT*” jest nieprawidłowy z punktu widzenia naukowego. Co ciekawe, opis w języku angielskim do tego rysunku w artykule P2 jest już prawidłowy, więc może to było niefortunne przetłumaczenie z j. angielskiego?
- (2) Artykuł P2 oraz P3 – test cytotoksyczności na ekstraktach: w metodyce dotyczącej testu cytotoksyczności jest napisane, że komórki były traktowane różnymi rozcieńczeniami ekstraktów. Dlaczego zatem nie zostały pokazane te wyniki na Rys. 5 w artykule P2 oraz w Tabeli 2 w artykule P3? Skoro nie była wyznaczana wartość IC_{50} , to nie bardzo rozumiem jaki był sens wykonywania badań dla różnych rozcieńczeń ekstraktu? Zgodnie z normą ISO 10993-5 istotny jest wynik otrzymany dla 100% ekstraktu, który nie powinien obniżać żywotności komórek o więcej niż 30%.
- (3) Artykuł P2 – test cytotoksyczności w kontakcie bezpośrednim: nie rozumiem dlaczego wyniki na Rys. 6 nie uwzględniają kontroli komórek hodowanej na polistyrenie w płytce wielodołkowej, która wg opisu w metodyce była wykonywana? Jeśli sam hydroksyapatyt obniżał żywotność komórek w porównaniu do kontroli komórek na polistyrenie, to wówczas żywotność oznaczona dla wszystkich badanych próbek jest zawyżona.
- (4) Artykuł P3 oraz P4 – test cytotoksyczności na ekstraktach: w przypadku chłonnych oraz porowatych próbek norma ISO 10993-12 rekomenduje przygotowanie ekstraktu stosując proporcję 100 mg próbki/1mL pożywki. Taką proporcję Doktorantka zastosowała



w artykule P2. Dlaczego w artykule P3 oraz P4 proporcja została zmieniona na 50 mg próbki/1mL płynu hodowlanego? Nie jest to błąd metodyczny, ponieważ wspomniana norma pozwala w uzasadnionych przypadkach zmienić rekomendowaną proporcję. Z czystej naukowej ciekawości chciałabym wiedzieć czym kierowała się Doktorantka dobierając takie proporcje przy tworzeniu ekstraktów?

- (5) Testy ilościowe we wszystkich artykułach: wszystkie testy ilościowe, zwłaszcza testy cytotoksyczności, powinny być wykonane w kilku niezależnych eksperymentach wraz ze stosowną analizą statystyczną. Wszystkie artykuły badawcze przedstawiają wyniki testu cytotoksyczności bez analizy statystycznej. W metodyce brakuje również informacji w ilu powtórzeniach został wykonany eksperyment, a w artykule P4 nie podano sposobu wyliczenia wartości IC_{50} .
- (6) Zarówno dodane do biomateriałów substancje lecznicze, jak i jony cynku oraz magnezu mogą mieć znaczący wpływ na proces regeneracji kości. Dlatego dobrym uzupełnieniem pracy doktorskiej byłoby przeprowadzenie testu na bioaktywność opracowanych biomateriałów oraz ocena różnicowania osteogennego osteoblastów na powierzchni próbek. Czy Doktorantka planuje rozszerzyć badania i kontynuować pracę nad opracowanymi biomateriałami?
- (7) Potencjalne implanty kostne oraz materiały kośćcozastępcze powinny mieć odpowiednią wytrzymałość mechaniczną. Czy Doktorantka rozważała wyznaczenie parametrów wytrzymałości na ściskanie oraz modułu Younga dla wytworzonych kształtek kompozytowych?

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Barbary Kołodziejkiej pt. „*Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćcozastępczy*” przedstawiona jako cykl powiązanych tematycznie publikacji jest bardzo wartościowym dziełem z zakresu nauk farmaceutycznych oraz nauk o biomateriałach. Mimo kilku krytycznych uwag, które wskazałam z obowiązku Recenzenta, chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Barbarę Kołodziejską pod kierunkiem dr hab. Joanny Kolmas prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i naukowy, o czym świadczy opublikowanie wyników badań w czasopiśmie z listy filadelfijskiej. Sumaryczny IF zgodnie z rokiem opublikowania dla wszystkich artykułów badawczych wynosi 14,2. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że uzyskane wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Warto również podkreślić aktywność naukową mgr Barbary Kołodziejkiej, która pełniła rolę kierownika w 2 projektach naukowych młodego badacza finansowanych ze źródeł



wewnętrznych oraz uczestniczyła łącznie w 6 konferencjach naukowych, głównie międzynarodowych. Ponadto Doktorantka jest współautorką łącznie 7 artykułów opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku IF = 26,692. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Barbarę Kołodziejską rozprawa doktorska spełnia wymagania zapisane w stosownej ustawie (Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce), 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, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejskiej oraz o dopuszczenie Jej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**