

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej
pt.: „Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt
jako materiał kośćcozastępczy”

Recenzja rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały nr 202/RDNF/D/2023 z dnia 29 listopada 2023 r. Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Rozprawę doktorską oceniam pod kątem spełnienia wymagań wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Kołodziejkiej została zrealizowana na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. Joanna Kolmas.

Rozprawa doktorska ma układ charakterystyczny dla rozpraw opartych na zbiorze publikacji i liczy 150 stron. Jest napisana w sposób logiczny i konsekwentny. Rozpoczyna się od wykazu publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej i następującym po nim wykazem dodatkowej działalności naukowej Doktorantki. Kolejnym elementem rozprawy jest streszczenie w języku polskim, jak i wymagane ustawowo, w języku angielskim. Kolejna część stanowi wykaz skrótów i akronimów, wstęp, przedstawienie celu, omówienie wykorzystywanych materiałów i metod oraz przedstawienie końcowych wniosków. Dodatkowym elementem rozprawy, godnym podkreślenia, było omówienie najważniejszych elementów nowości naukowej. Ostatnia część rozprawy, po spisie literaturowym, stanowi kopie publikacji będących efektem rozprawy doktorskiej z załącznikami oświadczeń Doktorantki jak i poszczególnych współautorów publikacji określających indywidualny wkład merytoryczny jak i procentowy każdego z nich w ich powstawanie. Załączone oświadczenia wkładu merytorycznego współautorów potwierdzają wiodącą rolę Doktorantki w tworzeniu koncepcji tematyki badawczej, planowaniu i przeprowadzaniu doświadczeń, interpretacji wyników i przygotowaniu oryginalnych wersji manuskryptów, co jednoznacznie podkreśla wysokie zaangażowanie Doktorantki w poszczególne etapy przygotowania prac.

Rozprawa doktorska jest oparta na czterech publikacjach, w tym jedna jest pracą przeglądową a pozostały trzy na dzień przygotowania recenzji - publikacjami oryginalnymi o łącznym współczynniku oddziaływania Impact Factor wynoszącym 17,823 i liczbą punktów MEiN równą 520. Publikacje ukazały się w latach 2020, 2022 i 2023, są trój lub czteroautorские i w każdej z nich Pani mgr Barbara Kołodziejska jest pierwszym autorem. Całkowity dorobek naukowy Pani mgr Barbary Kołodziejskiej jest również warty podkreślenia. Łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 26,692 i liczba punktów MEiN to 750. Ponadto Doktorantka brała udział w czterech konferencjach międzynarodowych i dwóch krajowych. Była kierownikiem w dwóch projektach naukowych "Młody Badacz", finansowanych w ramach subwencji konkursowej ze środków Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Działalność naukowa Doktorantki została dwukrotnie nagrodzona Nagrodą zespołową Rektora WUM. Stanowi to wystarczające dla recenzenta potwierdzenie dużej aktywności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Zabrakło mi jedynie podania indeksu Hirscha Doktorantki?

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Zapotrzebowanie na materiały kostnozastępcze wynika ze znacznego postępu i rozwoju chirurgii rekonstrukcyjnej i zabiegowej. Wśród nowoczesnych materiałów implantacyjnych to tkanki kostnej szczególne miejsce zajmują materiały oparte o fosforany wapnia, a zwłaszcza bioceramika hydroksyapatytowa. Przebieg procesów prowadzących do powstania fizykochemicznego wiązania pomiędzy implantami hydroksyapatytowymi a tkanką kostną nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Jeden z zaproponowanych modeli wskazuje na znaczący udział zjawisk fizycznych związanych z resorpcją i wytrącaniem fosforanów wapnia oraz wymiany jonowej. Szybkość tych procesów zależy od wielu czynników, między innymi od stopnia krystaliczności, morfologii kryształów, składu chemicznego czy porowatości hydroksyapatytu. Kontrola tych wszystkich czynników wymaga podejścia interdyscyplinarnego i tym samym wiedzy z wielu obszarów nauki. Dlatego otrzymanie wysoce biozgodnego i bioresorbowalnego materiału, który przypominałby składem chemicznym, morfologią oraz strukturą tkankę kostną jest trudnym zadaniem, którego podjęła się Doktorantka.

Doktorantka za główny cel badawczy postawiła sobie opracowanie procedury otrzymywania nowych, wielofunkcyjnych kompozytów apatytowo-kolagenowych.

W 16 stronicowym wstępie Doktorantka opisała syntetycznie i bardzo czytelnie wybrane biomimetyczne materiały kostnozastępcze oraz przedstawiła sposoby funkcjonalizacji i modyfikacji kompozytów apatytowo/kolagenowych wykorzystując znaczną ilość - 100 doniesień literaturowych. Opracowanie to jest również częściowo zawarte w publikacji przeglądowej wchodzącej w skład ocenianego cyklu prezentowanego w rozprawie. Wskazuje to na bardzo dobre teoretyczne przygotowanie Doktorantki do realizacji swoich celów i zadań badawczych. We wstępie jest również podrozdział nazwany „Dodatek substancji leczniczych”. Do tej części opracowania mam pytania Doktorantki, ponieważ zostały napisane pewne stwierdzenia, które chciałabym żeby zostały wyjaśnione czy też doprecyzowane, mianowicie cytuję, że „...małe (<10 µm), wzajemnie połączone pory są uważane za najlepsze do wbudowania się substancji leczniczej w strukturę kompozytu i później stosunkowo wolnego jej uwalniania w miejscu docelowym...” Nie jest to dla mnie w pełni zrozumiałe, dlatego chciałabym dopytać się Doktorantki dlaczego tak uważa? Zauważyłam również, że niektóre terminy są bezpośrednio tłumaczone z j. angielskiego i mogą być odbierane przez czytelnika jako edytorskie niedociągnięcia, dlatego obowiązkiem recenzenta jest ich wymienienie np. „... Substancja lecznicza może zostać osadzona na powierzchni kompozytu, ale także może zostać zamknięta w macierzy polimerowej, czemu sprzyja obecność porów...”. Są to oczywiście niewielkie błędy, które wynikają z tego, że wiele z anglojęzycznych terminów nie ma odpowiedników w języku polskim. Wspomniane błędy językowe nie mają wpływu na wysoki poziom merytoryczny recenzowanej rozprawy.

W celu pracy Doktorantka wyróżniła szczegółowe zadania badawcze, które były przedmiotem trzech publikacji oryginalnych należących do cyklu prezentowanego w rozprawie, związane one były z:

- opracowaniem warunków syntezy apatytu domieszkowanego jonami sodu, magnezu oraz węglanowymi;
- przeprowadzeniem charakterystyki fizykochemicznej i wstępnych badań biologicznych w warunkach *in vitro* otrzymanych na drodze syntezy apatytu domieszkowanego jonami;
- określeniem wpływu warunków syntezy na morfologię, krystaliczność i skład chemiczny domieszkowanych apatytów oraz wytypowaniem materiałów o parametrach najbardziej zbliżonych do apatytu biologicznego;
- opracowaniem metod otrzymywania materiałów kompozytowych zawierających kolagen typu I

i otrzymany przez Doktorantkę apatyt - najbardziej zbliżony do apatyty biologicznego (dodatkowo domieszkowany jonami cynku);

- nadaniem kompozytom różnych, trójwymiarowych kształtów przy jednoczesnym wzbogacaniu frakcji organicznej o nowe polimery naturalne;
- wprowadzeniem modelowych substancji leczniczych (ibuprofen lub kwas traneksamowy) do różnych kompozytów apatytowo/kolagenowych i analizą kinetyki ich uwalniania w warunkach *in vitro*;
- analizą wpływu składu i metody otrzymywania kompozytu na kinetykę uwalniania substancji leczniczej i jonów;
- przeprowadzeniem charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych kompozytów wraz ze wstępną oceną cytotoksyczności *in vitro*.

Należy podkreślić, że realizacja poszczególnych zadań badawczych była możliwa jedynie przy zastosowaniu wielu narzędzi analitycznych wykorzystywanych do badań ciała stałego, takich jak proszkowa dyfraktometria rentgenowska, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, transmisyjna mikroskopia elektronowa, skaningowa mikroskopia elektronowa, niskotemperaturowa adsorpcja azotu, spektroskopia emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnej sprzężonej czy też absorpcyjna spektrometria atomowa z atomizacją w płomieniu. Chciałabym podkreślić, że wytypowanie do badań wymienione techniki analityczne świadczą o dobrym analitycznym przygotowaniu Doktorantki do badań, co znalazło odzwierciedlenie w prawidłowo sformułowanych wnioskach oraz dyskusji z przedstawieniem również dalszych, koniecznych badań pogłębiających wiedzę. Do badań cytotoksyczności *in vitro* Doktorantka wytypowała dwie linie komórkowe: mysie fibroblasty BALB/c 3T3 oraz ludzkie komórki kostniakomięsaka MG-63, kierując się tym, iż pierwsza linia jest standardowo zalecana do ogólnej oceny cytotoksyczności zgodnie z wytycznymi ISO 10993-5:2009 dla materiałów medycznych, zaś druga jest powszechnie stosowana jako ludzki model osteoblastyczny w badaniach substytutów kości.

Dokonany opis poszczególnych publikacji przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej pozwala czytelnikowi zapoznać się z ogólną koncepcją, przebiegiem procesu badawczego i najważniejszymi wynikami.

W publikacji oryginalnej I *"Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites"*, Ceramics International, 2023, Doktorantka otrzymała apatyt domieszkowany jonami sodu, magnezu oraz jonami węglanowymi w ilościach zbliżonych do biologicznego apatyty tkanki kostnej, wykorzystując mokrą metodę strącaniową. Przedstawiła wpływ różnych warunków syntezy na właściwości fizykochemiczne i biologiczne materiałów. Doktorantka udowodniła, że kontrolowanie warunków syntezy poprzez dobór optymalnej temperatury, pH, stężenia reagentów i czasu dojrzewania materiału pozwoliły na otrzymanie apatytów o morfologii, krystaliczności i składzie chemicznym zbliżonym do apatyty biologicznego tkanki kostnej ssaków. Warto podkreślić, że Doktorantka otrzymała po raz pierwszy apatyt domieszkowany trzema jonami w jednym etapie – w odpowiednio zastosowanych warunkach syntezy. Wyniki tej pracy posłużyły Doktorantce do wytypowania do dalszych badań apatyty o parametrach fizykochemicznych i biologicznych najbardziej zbliżonych do apatyty tkanki kostnej.

Moja drobna uwaga dotyczy zastosowanych w rozprawie skrótów nazw próbek, np. LC11HT7, LC11RT7, bez ich rozwinięcia. Zdaniem recenzenta można byłoby je umieścić w wykazie skrótów i akronimów, co ułatwiłoby czytanie czytelnikowi.

W publikacji II *"A New, Biomimetic Collagen-Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery"* Materials 2022, Doktorantka wykorzystala domieszkowany apatyt jonami magnezu, cynku i jonami węglanowymi do wytworzenia apatytowo/kolagenowych kompozytów. Należy podkreślić, że Doktorantka przedstawiła metodę tworzenia kompozytów z użyciem zarówno kolagenu typu I, jak i atelokolagenu, zachowując stosunek masowy frakcji organicznej do mineralnej, identyczny jak w tkance kostnej. W literaturze naukowej do wytworzenia kompozytów zawierających kolagen najczęściej stosuje się kontrolowany proces liofilizacji. W celu realizacji założonych zadań badawczych, Doktorantka również zastosowała liofilizację, zabrakło mi jednak podania parametrów, w których ten proces był prowadzony. Wybór wprowadzonych do kompozytów substancji leczniczych został przez Doktorantkę bardzo dobrze uzasadniony. Wybrała ibuprofen sodu i kwas traneksamowy w celu otrzymania kompozytu kolagenowo/apatytowego pełniącego potencjalną funkcję nośnika leku o działaniu odpowiednio przeciwzapalnym lub hemostatycznym. Przeprowadziła analizę profili uwalniania substancji leczniczych prawidłowo podkreślając, iż porowatość kompozytów jest kluczowym parametrem wpływającym na szybkość uwalniania. Jednakże, w związku z

tym, że zaproponowane przez Doktorantkę kompozyty również pęczniały w środowisku wodnym, nasuwa się pytanie czy pęcznienie mogłoby mieć wpływ na szybkość uwalniania substancji leczniczej?

W publikacji III „*Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material*”. International Journal of Molecular Sciences 2023, Doktorantka zrealizowała swoje kolejne zadania badawcze i otrzymała nowe kompozyty apatytowo/kolagenowe na bazie alginianu sodu. Wybór tego polisacharydu Doktorantka uzasadniła możliwością nadania trójwymiarowej formy biomateriałom, odpowiedniej do wypełnienia nieregularnych ubytków kostnych. W celach modyfikujących uwalnianie substancji leczniczych Doktorantka zastosowała również powlekanie ww. kompozytów dodatkowo chitozanem. Chciałabym dopytać się Doktorantki w jaki sposób przeprowadziła proces powlekania, ponieważ nie znalazłam metodyki postępowania? Drugie moje pytanie związane jest tym, iż wykorzystanie tego polisacharydu do powlekania kompozytów apatytowych może wpłynąć do otrzymania materiału, którego potencjalna funkcja związana z regeneracją tkanki kostnej może zostać utracona lub zmniejszona w porywaniu do apatytu. W związku z tym chciałabym poznać zdanie Doktorantki na ten temat?

Doktorantka podkreśliła, że otrzymane przez Nią wyniki mają charakter podstawowy i stanowią podwaliny do dalszych testów biologicznych i klinicznych, które w dalszej perspektywie mogą doprowadzić do praktycznego zastosowania otrzymanych biomateriałów. Chciałabym zapytać się Doktorantki, w jaki sposób można ten cel praktycznego zastosowania zrealizować oraz na jakie trudności można się napotkać w czasie jego realizacji?

Pragnę dodać, że przedstawione powyżej pytania do Doktoranta nie umniejszają w żaden sposób wartości pracy i wynikają z czystej ciekawości naukowej. Jednocześnie chciałabym podkreślić, że poziom naukowy przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej spełnia wymagania stawiane przez Radę Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Podsumowując oceniana rozprawa doktorska autorstwa mgr Barbary Kołodziejkiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2002 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2 i 3 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie rozprawy Pani mgr Barbary Kołodziejkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 18.01.2024r.