



Politechnika Łódźka

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii



Łódź, 26.08.2020r.

Dr hab. inż. Agnieszka Nowak, prof. PŁ
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności PŁ w Łodzi

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr Marty Michalskiej-Sionkowskiej**

pt. „Otrzymanie i scharakteryzowanie materiałów kolagenowych pochodzenia naturalnego”

wykonanej na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Walczaka

Pomimo ciągłego postępu medycyny leczenie trudno gojących się ran nadal pozostaje wyzwaniem, szczególnie w dobie wzrastającej antybiotykooporności mikroorganizmów. Wiele bakterii chorobotwórczych rozwinęło oporność na główne klasy antybiotyków, a bakterie wielolekooporne powodują nieuleczalne infekcje. Szacuje się, że liczba zgonów powodowanych przez te mikroorganizmy może wzrosnąć do 2050 roku do 10 milionów, a koszt ich leczenia do 100 bilionów dolarów. Przesłanki te powodują, że ciągle poszukiwane są nowe materiały opatrunkowe. Idealny opatrunek na rany skórne powinien spełniać wiele wymagań, m. in. powinien stanowić barierę fizyczną zapobiegającą dalszym urazom i zanieczyszczeniom; być nośnikiem skutecznego środka bakteriobójczego; adsorbować nadmiar wysięków; zapewniać wymianę gazową. W leczeniu ran przewlekłych stosuje się różnorodne produkty syntetyczne, które jednak nie zawsze spełniają wszystkie stawiane im wymagania. Ze względu na dostępność, biodegradowalność i nietoksyczność naturalne biopolimery węglowodanów i białek mogą stanowić obiecującą alternatywę. Materiały te często cechują się zdolnością do tymczasowego podawania czynnika antydrobnoustrojowego, dostarczania go w ściśle

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173
tel. (+48 42) 631 34 79, fax: (+48 42) 631 32 74
e-mail: w5i53@adm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

określonym czasie, bądź cyklicznie. Wiedza na temat mechanizmów kontroli uwalniania unieruchomionego we wnętrzu matrycy związku, jak również jego wpływu na własności materiału opatrunkowego jest niezbędna w projektowaniu odpowiedniego systemu. Analizując liczbę publikacji naukowych, dotyczących zagadnień związanych z bioaktywnymi opatrunkami, można stwierdzić, że w bazie Web of Science znajduje się 400 pozycji (wyszukiwanie: „bioactive dressing” w tytule, abstrakcie, słowach kluczowych), opublikowanych w latach 2011-2020, przy czym notuje się zwiększającą się liczbę publikacji od 2014 roku (2011 - 25; 2014 - 32; 2020 - 72), co także świadczy o aktualności prowadzonych przez Doktorantkę badań.

Recenzowana praca obejmuje 140 stron maszynopisu. Całość poprzedzona została streszczeniem w języku polskim i angielskim i podzielona jest na rozdziały: Aktualny stan wiedzy, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Literatura. W tekście pracy znajduje się 14 tabel i 25 rycin wzbogacających początkowe rozdziały (Aktualny stan wiedzy, Materiały i metody) jak również stanowiących udokumentowanie uzyskanych wyników badań. W pracy cytowanych jest 295 pozycji literaturowych, w tym około 57% z ostatnich pięciu lat. Prezentacja wyników, a także dyskusja są przedstawione w sposób prosty i logiczny. Pod względem formalnym rozprawa spełnia wszystkie stawiane wymagania merytoryczne – ma charakter eksperymentalny i zawiera komplet wymaganych rozdziałów ułożonych w sekwencji typowej dla prac o charakterze doświadczalnym.

W rozdziale 1, opracowanym na podstawie literatury, Autorka pokrótce omawia problem antybiotykooporności mikroorganizmów (podrozdział 1.1) oraz fizjologię gojenia ran wspominając jednocześnie zagadnienie infekcji mikrobiologicznych (podrozdział 1.2). W kolejnych dwóch podrozdziałach (1.3 i 1.4) Doktorantka przedstawia przegląd piśmiennictwa na temat materiałów opatrunkowych ze szczególnym uwzględnieniem polimerów stosowanych do ich wytwarzania, w tym pochodzenia biologicznego. Na szczególne podkreślenie zasługuje aktualność cytowanych w tej części pozycji literaturowych. Zdecydowana większość z nich pochodzi z ostatnich pięciu lat. Ostatnia część przeglądu literatury (podrozdział 1.5) dotyczy związków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w materiałach opatrunkowych. Doktorantka omówiła kolejno cieszące się w ostatnich latach ogromnym zainteresowaniem nanocząski (AgNPs, nZnO, TiO₂NP) oraz miód, olejki eteryczne i związki fenolowe. Według mojej opinii tytuły podrozdziałów 1.5.3 oraz 1.5.4 są nieco

niefortunne, ponieważ ani miód ani olejki eteryczne nie są związkami chemicznymi, a mieszaniną tychże, co Autorka opisuje w treści podrozdziałów. Żałuję również, że podrozdział „Związki fenolowe” nie zawiera informacji na temat polifenoli stosowanych w materiałach opatrunkowych.

W rozdziale 2 przedstawiono cel pracy, którym było zaprojektowanie i otrzymanie na bazie kolagenu materiału, stanowiącego matrycę dla związków biobójczych pochodzenia naturalnego. Doktorantka postawiła sobie cztery cele szczegółowe: wytypowanie związków fenolowych i ich mieszanin o najlepszych właściwościach biobójczych (i), wytworzenie materiału biobójczego na bazie kolagenu i substancji biobójczych (ii), oznaczenie właściwości biobójczych otrzymanego materiału oraz jego wpływu na niektóre procesy komórkowe (iii), charakterystyka właściwości fizykochemicznych materiałów aktywnych (iv). Ogólnie należy stwierdzić, że cel pracy został sformułowany prawidłowo i koreluje z dalszą częścią rozprawy.

W kolejnym rozdziale Doktorantka opisała materiały i metody stosowane podczas pracy doświadczalnej. Stosowane w pracy metody zostały poprawnie opisane co stwarza warunki do powtórzenia badań i pomiarów. Mocną stroną prowadzonych badań był ich szeroki zakres, pozwalający na szczegółowe scharakteryzowanie otrzymanego materiału kolagenowego. Zastosowane techniki i metody pomiarowe wymagały dobrego merytorycznego oraz analitycznego przygotowania Doktorantki. Metodyka pracy obejmuje zarówno oznaczenia rutynowe, wynikające z ogólnie przyjętych procedur, jak i nowoczesne metody analityczne, np. ATR-FTIR, AFM, SEM. Do tej części mam kilka szczegółowych uwag/pytań.

1. W jaki sposób wyznaczano strefę zahamowania wzrostu podczas badań, czy uwzględniając wielkość stosowanych kwadratów celulozowych? Co było próbą odniesienia?
2. Przedstawione w tabeli 2 skróty nie są spójne z dalszą częścią pracy (np. tab. 7, 8, 10, 12)
3. Brak jest w spisie literatury pozycji Zhou i wsp. (2011) cytowanej w opisie badań biokompatybilności. Jeśli pozycją tą jest Zhou, H. Y., Zhang, Y. P., Zhang, W. F., & Chen, X. G. (2011). Biocompatibility and characteristics of injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel for drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.022>. to autorzy opisując

metodykę odnoszą się do normy ISO 10993-5. Uważam, że w takiej sytuacji należałoby się odnieść raczej do materiału źródłowego.

4. Dlaczego Doktorantka badała jedynie wpływ tymolu (w stężeniach 0,5 i 0,75mg/cm²) unieruchomionego w materiale na tworzenie biofilmu?

Zasadniczą część pracy stanowi rozdział 4 – Wyniki i dyskusja. Na początkowym etapie badań Doktorantka przeprowadziła eksperyment pozwalający na wytypowanie spośród czterech związków fenolowych (karwakrol, tymol, gwajakol, eugenol) oraz ich dwuskładnikowych mieszanin związków/mieszanin o najwyższym potencjale pozwalającym na zastosowanie w materiałach biobójczych. Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej metodą Warda. Czuję niewielki niedosyt jeśli chodzi o wyciągnięcie wniosków na podstawie grupowania hierarchicznego. Drobną uwagę dotyczy również dokładności wyników podanych w tabelach 3-6. Czy dysponowano przyrządem pozwalającym na pomiar strefy zahamowania wzrostu z dokładnością do 0,1mm? Doktorantka do dalszych badań wytypowała dwa z badanych związków (tymol i karwakrol) oraz ich mieszaninę. W dalszej części dysertacji opisano właściwości otrzymanego materiału kolagenowego. Zarówno w opisie wyników jak i w części metodycznej nie znalazłam informacji na temat stężenia niejonowego surfaktantu dodawanego do materiału. Informacja ta może być istotna ze względu na fakt, że autorka wnioskuje, że to właśnie Polisorbat 80 odpowiada za brak biokompatybilności uzyskanego materiału. Doktorantka przebadła własności bójcze otrzymanych materiałów w stosunku do dwóch szczepów bakterii: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 oraz *Escherichia coli* ATCC 8739. W większości statystyk epidemiologicznych analizujących zakażenia ran, w tym typu SSI (ang. surgical site infections), zaznacza się przeważający udział *S. aureus* Jednakże dość często wymieniane są również inne gatunki np. pałeczki niefermentujące *Pseudomonas aeruginosa* lub *Acinetobacter* spp., ziarniaki należące do rodzaju *Streptococcus* czy gatunki z rodzajów: *Corynebacterium*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bacteroides*, *Peptoniphilus*, *Finegoldia*. Czy Autorka rozważała rozszerzenie zakresu prowadzonych badań? Doktorantka wykazała, że wszystkie badane materiały zawierające pojedyncze związki fenolowe (tymol lub karwakrol) w stężeniu od 0,25 do 4 mg/cm² powodowały redukcję liczebności badanych mikroorganizmów o co najmniej 2 rzędy logarytmiczne co pozwala uznać je za bakteriobójcze. W przypadku wprowadzenia do matrycy kolagenowej mieszaniny obu

związków współczynnikiem redukcji pozwalającej na stwierdzenie bakteriobójczości w stosunku do *S. aureus* charakteryzowały się jedynie materiały o stężeniu mieszaniny TYM/KAR w przedziale 0,75-4,0 mg/cm², a w stosunku do *E. coli* 0,5-4,0 mg/cm². Autorka udowodniła również, że uzyskane przez nią bioaktywne materiały wpływają na aktywność dehydrogenaz oraz zmniejszają ilość tworzonego przez testowane mikroorganizmy ATP. Doktorantka przeanalizowała również zdolność tworzenia biofilmu na badanych materiałach przez gronkowce z gatunku *S. aureus*. Ta część badań budzi moje wątpliwości. Jakość dokumentacji fotograficznej nie pozwala mi na ocenę uzyskanych przez Autorkę badań. Dlaczego nie zastosowano ilościowych metod oceny tworzenia biofilmu? Można było również bazować na metodach barwienia fluorescencyjnego co wzbogaciłoby tę część pracy. Istotnym elementem przeprowadzonych badań była ocena biokompatybilności uzyskanych materiałów. Niestety okazało się, że wszystkie materiały powodują hemolizę powyżej 5% erytrocytów, co nie pozwala uznać ich za biokompatybilne. Analizując wyniki badań Autorka zasugerowała, że w znacznej mierze za hemolizę odpowiedzialny jest zastosowany Polisorbat 80. Czy zatem podjęta została próba zmniejszenia stężenia tego związku w materiale. Czy Autorka ma propozycję jaki inny surfaktant można byłoby zastosować i jak wpłynęłoby to na właściwości fizykochemiczne materiału?

Kolejny podrozdział dotyczy podatności wytworzonych w ramach pracy, z dodatkiem tymolu, materiałów kolagenowych na degradację z udziałem kolagenazy typu I. Autorka określiła, że dodatek tego związku, z wyjątkiem najniższego stężenia, nie wpływa na podatność materiału na degradację. Cecha ta sprawia, że materiał opatrunkowy na bazie kolagenu może stanowić dodatkowe źródło białka wykorzystywane w procesie angiogenezy i przebudowy tkanki.

Autorka zbadała również wiele innych cech fizykochemicznych materiałów kolagenowych z dodatkiem fenoli, które wpływają na skuteczność materiałów w leczeniu zakażeń. Ważnym w tym zakresie aspektem jest wiązanie związków aktywnych z matrycą kolagenową i ich stopniowe uwalnianie. Doktorantka określiła przy użyciu techniki ATR-FTIR (podrozdział 4.9), że istnieją interakcje pomiędzy grupami funkcyjnymi fenoli i kolagenu, polegające na tworzeniu oddziaływań wodorowych między grupami -NH białka i -OH fenoli. Dzięki obrazowaniu powierzchni materiałów z zastosowaniem AFM Doktorantka określiła, że najbardziej integralnym materiałem był ten z dodatkiem tymolu, szczególnie w niższych stężeniach. Materiały z karwakraolem

i mieszaniną obu związków prawdopodobnie nie tworzyły stabilnej emulsji, co skutkowało częściowym odparowaniem związków aktywnych (podrozdział 4.10). Pomiar kąta zwilżania pozwolił Doktorantce na stwierdzenie, że dodatek związków fenolowych do matrycy kolagenowej potęgował hydrofobowość powierzchni (podrozdział 4.11)

Podczas gojenia ran w fazie oczyszczania upośledzeniu przez RFT ulegają kompleksowe, nieswoiste reakcje obronne organizmu, mające na celu usunięcie patogennych drobnoustrojów, oczyszczenie rany z zakażonych lub uszkodzonych, martwiczych tkanek i przygotowanie do procesów proliferacji. Dlatego ważną cechą materiałów bioaktywnych może być ich aktywność antyoksydacyjna. Autorka określała właściwości materiałów kolagenowych w stosunku do rodnika DPPH (podrozdział 4.12). Również w tym przypadku najlepszymi własnościami antyoksydacyjnymi wykazał się materiał z dodatkiem tymolu. Pozostałe materiały również wykazywały zdolność do zmiatania wolnych rodników, jednak w tym przypadku Doktorantka stwierdziła brak korelacji pomiędzy stężeniem karwakuolu a aktywnością antyoksydacyjną. Zatem materiał polimerowy z wbudowanymi fenolami może wpływać korzystnie na leczenie ran.

Analizowany przez autorkę materiał poddany został również badaniom w zakresie możliwości biosorbcji (podrozdział 4.13). Autorka określiła, że wraz ze wzrostem stężenia związków aktywnych zwiększa się ubytek masy badanych materiałów. Doktorantka wnioskowała, że jest to spowodowane nie tylko degradacją materiałów ale również uwalnianiem związków fenolowych z matrycy. Kolejny etap badań potwierdził, że rzeczywiście związki fenolowe są częściowo uwalniane z matrycy (rozdział 4.14). Mam jednak wątpliwości czy np. około 50% wzrost ubytku masy może być spowodowany uwolnieniem $4\text{mg}/\text{cm}^2$ tymolu unieruchomionego w materiale. Czy może jednak jest to spowodowane wpływem fenoli na strukturę materiału. Czy Autorka mogłaby się do tego odnieść? Jednocześnie stopniowe uwalnianie fenoli powoduje, że uzyskane przez Doktorantkę materiały nie działają jedynie w formie bezpośredniego kontaktu. Czy rozważała Pani aby określić dynamikę uwalniania tych związków?

Ze względu na to, że jednym z kluczowych parametrów wpływających na proces gojenia jest poziom wilgotności jak również poziom zawartości tlenu i ditlenku węgla w jej otoczeniu Doktorantka określiła przepuszczalność par i gazów dla wybranych materiałów. Ubolewam nad tym, że do badania wybrano jedynie jeden z materiałów z wbudowanym fenolem i to w stężeniu $4\text{mg}/\text{cm}^2$, pomimo, że Autorka stwierdza,

że najlepszymi właściwościami cechowały się materiały kolagenowe z dodatkiem 0,25-0,5mg/cm² tymolu. Tym bardziej, że jak wynika z uzyskanych przez autorkę wyników badań związek ten wpływa na określone parametry.

Otrzymane wyniki badań pozwoliły Autorce na sformułowanie dziesięciu ciekawych i istotnych wniosków (rozdział 5), mających przede wszystkim wartość poznawczą, ale także zawierających elementy, wskazujące na ich znaczenie aplikacyjne. Do tej części mam dwa pytania:

1. Co Autorka rozumie poprzez sformułowanie, że „materiały z karwakraolem sprawiały problemy technologiczne” (str 112)?
2. Na jakiej podstawie materiały o zawartości 0,25-0,5mg/cm² tymolu zostały wybrane jako oznaczające się najlepszymi cechami? Czy możliwe było zastosowanie jakichś metod matematycznych na poparcie tego wniosku?

Biorąc pod uwagę cel i zakres pracy, stosowane metody, sposób przedstawienia i interpretacji wyników oraz wnioski uważam, że praca pt. „Otrzymanie i scharakteryzowanie materiałów kolagenowych pochodzenia naturalnego” została wykonana zgodnie z zasadami realizacji pracy naukowej i pod względem merytorycznym nie budzi zastrzeżeń. Praca ma charakter nowatorski, dotyczy zagadnienia, cieszącego się coraz większym zainteresowaniem badaczy. Napisana jest rzetelnie, poprawnym, fachowym językiem, chociaż autorka nie ustrzegła się sformułowań z którymi można dyskutować lub są uchybieniami językowymi, przykładowo:

- 11³⁰-12² „Przekazywanie genów przy pomocy plazmidów zachodzi na drodze koniugacji, transdukcji i transformacji lub przy pomocy fimbrii zwanych pilami”
- 25²⁹ „kontrowane uwalnianie”
- 35¹⁷⁻¹⁸ „miód manuka znany jako *Leptospermum scoparium*”
- 61²¹ „*Salmonella typhi*”

Podsumowanie

Recenzowana praca Mgr Marty Michalskiej-Sionkowskiej pt. „Otrzymanie i scharakteryzowanie materiałów kolagenowych wzbogaconych w związki biobójcze pochodzenia naturalnego” stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego. Dzięki odpowiednio zaplanowanym badaniom i wykonanym analizom cel pracy został zrealizowany. Zarówno rezultaty doświadczeń, jak i wynikające z nich wnioski są wartościowe, zasługują na upowszechnienie. Mgr Marta Michalska-Sionkowska

7

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173
tel. (+48 42) 631 34 79, fax: (+48 42) 631 32 74
e-mail: w5i53@adm.p.lodz.pl, www.p.lodz.pl

wykazała się umiejętnością podjęcia zadania badawczego wychodzącego naprzeciw aktualnym zapotrzebowaniom, przeprowadzenia eksperymentów, dokonania analizy otrzymanych danych liczbowych, przeprowadzenia dyskusji naukowej i merytorycznie poprawnego wnioskowania. Dojrzałość naukową Doktorantki potwierdza również jej imponujący dorobek publikacyjny. Wg bazy Scopus jest współautorem 19 publikacji o łącznym wskaźniku IF 52,016, indeks Hirscha = 9.

Zgłoszone do pracy uwagi mają charakter dyskusyjny, służą uporządkowaniu pewnych zagadnień i zasygnalizowaniu aspektów wartych rozważenia.

Biorąc pod uwagę wartość naukową pracy i zawarte w niej elementy nowości naukowej, a także zakres wykonanych badań, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa Mgr Marty Michalskiej-Sionkowskiej w pełni spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2002r wraz z późn. zm. i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Agnieszka Nowak, prof. PŁ