

Lublin, dn. 12.04.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Szałapaty pt. „Właściwości wybranych materiałów biomedycznych modyfikowanych inhibitorami enzymów proteolitycznych” wykonanej w Zakładzie Biochemii na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Anny Jarosz-Wilkołazkiej, prof. UMCS

Biomateriały zajmują ważne miejsce we współczesnej medycynie, zwłaszcza w aspekcie medycyny regeneracyjnej czy inżynierii tkankowej. Jednym z istotnych problemów związanych ze wszczepianiem biomateriałów do organizmu ludzkiego są powikłania infekcyjne zwane zakażeniami związanymi z biomateriałami lub zakażeniami okołowszczepowymi. Zakażenia te poprzedzone są adhezją drobnoustrojów do powierzchni biomateriałów, co prowadzi do wytworzenia struktury biofilmu, a w konsekwencji do rozwoju lokalnego stanu zapalnego czy też zakażenia uogólnionego związanego z obecnością drobnoustrojów w łożysku naczyniowym i sepsy. W związku z tym prowadzone są badania nad nowymi biomateriałami, które nie będą podatne na adhezję drobnoustrojów, lub modyfikacjami powierzchni znanych biomateriałów w celu zwiększenia ich właściwości antyadhezyjnych i przeciwdrobnoustrojowych.

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Szałapaty było opracowanie optymalnych warunków immobilizacji trzech inhibitorów proteaz serynowych (inhibitora AEBSF, inhibitora sojowego oraz α_1 -antytrypsyny), unieruchamianych kowalencyjnie na powierzchni wybranych materiałów biomedycznych oraz określenie podstawowych właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych modyfikowanych biomateriałów, otrzymanych w wyniku tego procesu. Cel rozprawy doktorskiej, wpisujący się w aktualne kierunki badań nad biomateriałami, został jasno sformułowany, odzwierciedlając zadania badacze zaplanowane do realizacji w toku pracy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania formalne. Ma układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym i zawiera następujące

rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski oraz Bibliografia. Należy zaznaczyć, że zachowane zostały odpowiednie proporcje pomiędzy zasadniczymi rozdziałami, tj. Wstępem oraz badaniami własnymi Doktorantki wraz z ich omówieniem. Ponadto, w pracy umieszczono Streszczenie, Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Spis Rycin oraz Spis Tabel. Praca liczy 157 stron i zawiera 37 tabel oraz 49 rycin. Piśmiennictwo obejmuje 212 publikacji oraz 6 stron internetowych, związanych z tematyką rozprawy, w tym 53 pozycje z lat 2013-2018.

W pracy zawarto również informacje o 4 projektach/grantach, w ramach których były realizowane badania. Według mnie informacja o prestiżowym projekcie PRELUDIUM finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki powinna być zamieszczona na początku pracy, choć zwyczajowo w publikacjach informacje tego typu podaje się na końcu. Ponadto, w pracy Doktorantka przedstawiła swój dorobek naukowy, z uwzględnieniem publikacji i komunikatów konferencyjnych prezentowanych w formie ustnej i posterów, przedstawiających wyniki zamieszczone w pracy.

Oceniając rozprawę doktorską pod względem merytorycznym, należy zaznaczyć, że recenzowana przeze mnie dysertacja świadczy o wszechstronnej wiedzy Doktorantki w zakresie problemów dotyczących biomateriałów stosowanych w medycynie, zarówno w aspekcie teoretycznym jak i praktycznym. We Wstępie Doktorantka omówiła w sposób syntetyczny wybrane biomateriały stosowane w medycynie, jak również przedstawiła aktualne problemy związane z zakażeniami okołowszczepowymi z uwzględnieniem najważniejszych czynników etiologicznych tych zakażeń oraz istotnego udziału biofilmu w ich patogenezie. Ważny podrozdział Wstępu opisuje metody umożliwiające ochronę przeciwbakteryjną biomateriałów, w tym modyfikacje ich powierzchni nadające im właściwości antyadhezyjne i/lub przeciwdrobnoustrojowe. We Wstępie Doktorantka opisała również możliwości zastosowania inhibitorów proteaz w medycynie jako czynników przeciwdrobnoustrojowych, biorąc pod uwagę fakt, że enzymy proteolityczne są jednym z ważnych czynników patogenności drobnoustrojów.

W rozdziale Materiał i metody Doktorantka opisała zastosowane w pracy inhibitory proteaz, nośniki stosowane do immobilizacji, szczepy wzorcowe drobnoustrojów oraz odczynniki i sprzęt laboratoryjny. Na uwagę zasługuje szczegółowy i przejrzysty opis metod badawczych wykorzystanych w toku pracy, świadczący o opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego i trudnego warsztatu eksperymentalnego w zakresie badań nad biomateriałami.

Metody badawcze obejmowały opis eksperymentów w zakresie uwarunkowań procesu immobilizacji inhibitorów proteaz na powierzchni szkła porowatego lub wybranych biomateriałów – protezy Uni-Graft K DV (proteza poliestrowa impregnowana żelatyną), protezy Codubix (proteza poliestrowo-polipropylenowa) oraz protezy Hemagard Intergard (proteza poliestrowa impregnowana kolagenem), jak również w zakresie analizy właściwości przeciwdrobnoustrojowych (przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych), cytotoksyczności oraz struktury powierzchni zmodyfikowanych biomateriałów.

Wyniki uzyskane w toku pracy Doktorantka przedstawiła w postaci 20 tabel i 42 rycin, opisując je w sposób systematyczny. Doktorantka przedstawiła dane opisujące optymalizację procesu immobilizacji inhibitorów proteaz z zastosowaniem szkła porowatego jako nośnika, podając optymalne stężenie inhibitora oraz rodzaj i stężenie związku siecującego, jak również dane dotyczące stabilności immobilizowanych w tych warunkach inhibitorów proteaz. Następnie opisała wydajność immobilizacji inhibitorów proteaz na stosowanych w pracy biomateriałach, zaznaczając, że najwyższą aktywność immobilizowanych inhibitorów wykazano w przypadku protezy Uni-Graft. Ponadto, oceniła udział wiązań kowalencyjnych i niekowalencyjnych w procesie immobilizacji inhibitorów. Przedstawiła dane dotyczące stabilności immobilizowanych inhibitorów w różnych warunkach środowiska i przy zastosowaniu różnych metod sterylizacji. Zasadnicza część wyników dotyczyła oceny właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych zmodyfikowanych biomateriałów z immobilizowanymi inhibitorami proteaz. Badania te poprzedzono oznaczeniem dwóch podstawowych parametrów opisujących wrażliwość drobnoustrojów na związki przeciwdrobnoustrojowe, tj. MIC (minimal inhibitory concentration) i MBC (minimal bactericidal concentration) lub MFC (minimal fungicidal concentration). Chciałabym zwrócić uwagę, że zgodnie z obowiązującymi standardami wymienionym powyżej parametrom powinny być przyporządkowane konkretne wartości liczbowe, np. 0,25 mg/ml, a nie $> 0,25$ mg/ml. Zazwyczaj w tego typu badaniach stosuje się standardowe inokulum, np. 0,5 w skali McFarlanda lub odpowiednie jego rozcieńczenia. W Tabelach 23-25 Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące stopnia redukcji gęstości populacji drobnoustrojów w obecności natywnych inhibitorów oraz inhibitorów unieruchomionych na powierzchni protez. Uważam, że tytuł tej Tabeli jest trochę mylący, ponieważ zawarte w niej dane przedstawiają, zgodnie z opisem w tekście, gęstość populacji drobnoustrojów traktowanych inhibitorami w porównaniu do gęstości populacji kontrolnej. Może lepiej byłoby te dane przedstawić w postaci wykresów. Uzyskane wyniki wskazują na niewielki wpływ inhibitorów zarówno w

formie natywnej jak i immobilizowanej na badane drobnoustroje w postaci hodowli płynnych. Doktorantka przeprowadziła bardzo ważne z praktycznego punktu widzenia eksperymenty, umożliwiające ocenę adhezji badanych drobnoustrojów do powierzchni zmodyfikowanych biomateriałów w porównaniu z niemodyfikowanymi biomateriałami, a następnie tworzenia biofilmu. Uzyskane wyniki wskazują, że tylko niektóre ze zmodyfikowanych biomateriałów wykazywały właściwości antyadhezyjne i antybiofilmowe, ograniczając przyleganie do ich powierzchni wybranych drobnoustrojów, a w konsekwencji hamowanie tworzenia biofilmu, zwłaszcza w przypadku *S. aureus* oraz protezy Uni-Graft. Najbardziej efektywny okazał się syntetyczny inhibitor AEBSF. Doktorantka wykorzystując techniki mikroskopowe (SEM) wykazała bardzo interesującą cechę modyfikowanych biomateriałów, tj. występowanie drobnoustrojów na powierzchni w postaci rozproszonych komórek w odróżnieniu od niemodyfikowanych biomateriałów, gdzie drobnoustroje występowały na powierzchni w postaci skupisk i mikrokolonii otoczonych macierzą zewnątrzkomórkową. Ponadto, zmodyfikowane biomateriały nie wykazywały efektu cytotoksycznego w stosunku do prawidłowej linii ludzkich komórek nabłonkowych HSF. Ponadto, wykazała, że modyfikacja biomateriałów inhibitorami proteaz spowodowała wygładzenie powierzchni lub zwiększenie chropowatości, w zależności od zastosowanego inhibitora.

Rozdział Dyskusja stanowi wnikliwą i wszechstronną analizę wyników uzyskanych przez Doktorantkę w toku pracy w konfrontacji z wynikami innych autorów z ośrodków badawczych z kraju i ze świata, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej. W Dyskusji Doktorantka poruszyła przede wszystkim problemy związane z modyfikacjami biomateriałów, przedstawiając wady i zalety poszczególnych rozwiązań, w tym zaproponowanej w pracy modyfikacji z zastosowaniem inhibitorów proteaz, w aspekcie ograniczania występowania zakażeń związanych z biomateriałami. W tym rozdziale Doktorantka przedstawiła plany dalszych badań, które będą cenną wskazówką w ocenie efektywności i przydatności biomateriałów modyfikowanych inhibitorami proteaz w praktyce klinicznej.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła logiczne wnioski, dotyczące samego procesu immobilizacji jak i właściwości biologicznych i fizyko-chemicznych zmodyfikowanych biomateriałów. Można byłoby też sformułować końcowy wniosek, podsumowujący osiągnięcia tej bardzo cennej i interesującej pracy.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe rozwiązanie problemu badawczego, jakim jest opracowanie nowej metody modyfikacji biomateriałów poprzez kowalencyjną immobilizację inhibitorów enzymów proteolitycznych na powierzchni wybranych biomateriałów wraz z uzyskaniem nowych właściwości tych biomateriałów, w tym właściwości antyadhezyjnych i antybiofilmowych. Pani mgr Katarzyna Szałapata jest niewątpliwie ekspertem w tej dziedzinie. Pewne niedociągnięcia zauważone w pracy, głównie o charakterze redakcyjnym i błędów edytorskich, oraz komentarze zawarte w treści recenzji nie wpływają na ogólną, bardzo wysoką ocenę pracy i mogą być skorygowane podczas przygotowywania pracy do druku.

Recenzowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jak i merytorycznym. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie –Skłodowskiej w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Szałapaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej i jej istotne znaczenie w aspekcie nowych rozwiązań w dziedzinie biomateriałów, jak również dorobek naukowy Doktorantki, stawiam wniosek o wyróżnienie tej pracy.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej

prof. dr hab. Anna Malm