

Białystok, 24.04.2018.

Prof. dr hab. Marian Tomasiak
Zakład Chemii Fizycznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Kilińskiego 1, 15-089 Białystok

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tytuł: Właściwości wybranych materiałów biomedycznych modyfikowanych inhibitorami enzymów proteolitycznych

Autor: mgr Katarzyna Szaląpata

Promotor: dr hab. Anna Jarosz-Wilkolazka, prof. nadzw. UMCS,

Jednym z ważnych osiągnięć współczesnej chirurgii są operacje, podczas których chorym są wszczepiane różnego rodzaju sztuczne implanty czy protezy. Przykładowo, protezy naczyniowe zrewolucjonizowały chirurgię naczyniową, umożliwiając normalne funkcjonowanie pacjentom, którzy bez nich byłiby skazani na unieruchomienie do końca życia. Podobnie stało się w chirurgii ortopedycznej, gdzie do niedawna uszkodzenie szyjki kości udowej było dla chorego równoznaczne z trwałym inwalidztwem.

Niestety operacje wszczepiania protez związane są ryzykiem powstawania powikłań infekcyjnych, które mogą wystąpić bezpośrednio lub nawet wiele miesięcy lub lat po zabiegu implantacji. Opisywana w literaturze częstość powikłań infekcyjnych po operacjach rekonstrukcji naczyń wynosi 1–10%, a infekcje wszczepionej protezy dotyczą 1–3% operowanych chorych. Dzieje się tak pomimo wykorzystywania coraz doskonalszych materiałów biomedycznych, profilaktyki antybiotykowej oraz technik operacyjnych.

W celu zminimalizowania powikłań infekcyjnych na powierzchni protez często immobilizuje się antybiotyki, które przez dłuższy czas mogą być uwalniane w miejscu implantacji. Jednak wadą takiego rozwiązania jest powstawanie lekooporności.

Istnieje więc pilna konieczność projektowania nowych materiałów biomedycznych do konstrukcji protez wykazujących trwałe właściwości bakteriobójcze i/ lub bakteriostatyczne.

Dobrym przykładem próby sprostania takiemu zapotrzebowaniu jest niniejsza rozprawa doktorska.

Doktorantka badała możliwość wykorzystania inhibitorów enzymów proteolitycznych do nadawania aktualnie stosowanym materiałom biomedycznym (protezom) zdolności zapobiegania adhezji do ich powierzchni drobnoustrojów chorobotwórczych i hamowania powstawania biofilmu wytwarzanego przez te drobnoustroje. Zaproponowane rozwiązanie jest nowatorskie i bardzo ciekawe.

Doktorantka bardzo dokładnie sprawdziła możliwość zastosowania trzech już dość dobrze znanych inhibitorów proteaz serynowych: syntetycznego inhibitora AEBSF (fluorek 4-(2-aminoetylo benzenesulfonylu) oraz dwóch inhibitorów naturalnych - inhibitora sojowego oraz ludzkiej α_1 -antytrypsyny. Dobór tych inhibitorów był poprzedzony staranną analizą danych literaturowych, które wyraźnie wskazują, że inhibitory enzymów proteolitycznych mogą wykazywać właściwości przeciwwirusowe i przeciwdrobnoustrojowe. Ponadto proteazy pochodzenia drobnoustrojowego zaliczane są do bakteryjnych i grzybowych czynników wirulencji oraz biorą czynny udział w powstawaniu biofilmu.

Bardzo dobrym pomysłem jest zaproponowanie przez Doktorantkę wykorzystania AEBSF, który hamuje m.in. chymotrypsynę, kalikreninę, plazminę, trombinę i trypsynę i wykazuje specyficzność podobną do dobrze już znanego inhibitora PMSF. Jego zdolność do hamowania trombiny pozwala przypuszczać, że po immobilizacji na powierzchni protezy naczyniowej może jej nadać nie tylko zdolność unieszkodliwiania mikroorganizmów pojawiających się w miejscu implantacji, ale także właściwości przeciwwązkowe. Ponadto AEBSF jest bardzo stabilny przy niższych wartościach pH i z uwagi na fakt, że jest syntetyczny, będzie też relatywnie tani.

W pierwszym etapie badań Doktorantka opracowała techniki kowalencyjnej immobilizacji badanych inhibitorów na powierzchni materiałów biomedycznych używanych do produkcji protez Uni-Graft (proteza poliestrowa impregnowana żelatyną stosowana m.in. do zabiegów na tętnicach), protez kości czaszki Codubix (proteza poliestrowo – polipropylenowa o właściwościach mechanicznych podobnych do kości) oraz protez naczyniowych Hemagard (proteza dziana poliestrowa impregnowana kolagenem). Ten etap badań obejmował opracowanie optymalnych warunków immobilizacji wybranych inhibitorów proteaz na szkle o kontrolowanej porowatości (dobór optymalnego stężenia inhibitora, dobór rodzaju związku sieciującego i jego stężenia). Tak ustalone procedury wiązania inhibitorów do powierzchni szkła zostały następnie wykorzystane do opracowania

techniki immobilizacji inhibitorów na powierzchni wybranych materiałów biomedycznych (protez).

Doktorantka wykazała, że optymalnym czynnikiem sieciującym do immobilizacji inhibitorów proteaz na powierzchni biomateriałów jest aldehyd glutarowy. Uzyskana wydajność immobilizacji wahała się w zakresie od 11 do 51%. Inhibitory proteaz po immobilizacji do badanych biomateriałów nie traciły zdolności do hamowania trypsyny. Ponadto w niektórych kombinacjach obserwowano nawet wzrost ich zdolności hamujących. Poza tym uzyskane koniugaty biomateriałów z inhibitorami proteaz były stabilne w środowisku o różnych wartościach pH i temperatury, a także po sterylizacji promieniowaniem UV i po dwumiesięcznym okresie przechowywania w chłodzie.

Kolejnym etapem badań było analiza właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybowych modyfikowanych biomateriałów. Analiza aktywności biologicznej względem szczepów *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans* wykazała, że modyfikowane biomateriały mogą wpływać hamująco na wzrost i namnażanie komórek drobnoustrojów oraz ograniczać ich zdolność do adhezji i wytwarzania biofilmu. Warto podkreślić, że powstawanie biofilmu bakteryjnego na powierzchni modyfikowanych biomateriałów Doktorantka śledziła przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego.

Doktorantka wykazała także, że biomateriały (Uni-Graft) modyfikowane AESBF lub ludzką α_1 -antytrypsyną nie wykazują właściwości cytotoksycznych względem ludzkich fibroblastów skóry.

Doktorantka badała także zmiany w strukturze powierzchni protez, powstające na skutek procesu immobilizacji inhibitorów proteaz. Analiza struktury powierzchni z zastosowaniem profilometru optycznego wykazała, że w zależności od zastosowanego inhibitora może dochodzić zarówno do wygładzenia powierzchni protezy, jak i do zwiększenia jej chropowatości.

Reasumując, badania przeprowadzone przez Doktorantkę wyraźnie wskazują, że modyfikacja obecnie stosowanych biomateriałów inhibitorami proteaz jest nowym, niezwykle obiecującym kierunkiem badań, które mogą doprowadzić do powstania protez wykazujących trwałe właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co w praktyce zapewne przyczyni się do redukcji częstości powikłań infekcyjnych po implantacji.

Wykonane przez Doktorantkę ta badania uważam za uzasadnione i przydatne z poznawczego, ale przede wszystkim – z praktycznego punktu widzenia.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma ogólnie przyjęty układ. Liczy 157 stron maszynopisu. Obejmuje trzynaście rozdziałów: streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie (część teoretyczna), cel pracy, część doświadczalną (materiały i metody), omówienie wyników, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, spis tabel, spis rycin, wykaz prac naukowych Doktorantki, oraz załączniki. W pracy znajduje się 49 rycin i 37 tabel. Stanowią one staranną i bardzo obszerną ilustrację pracy wykonanej przez Doktorantkę. Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka sformułowała 7 wniosków.

Praca została napisana bardzo starannie i przejrzysto, a jej strona edytorska i język poza kilkoma drobnymi usterkami nie budzi większych zastrzeżeń.

W części teoretycznej Doktorantka przedstawiła aktualny stan wiedzy o biomateriałach stosowanych obecnie w medycynie, opisała mikroorganizmy najczęściej wywołujące zakażenia protez, zjawisko biofilmu i jego rolę w powstawaniu tych zakażeń oraz opisała aktualnie stosowane metody redukujące występowanie powikłań infekcyjnych w miejscu implantacji protezy. W końcowej części wprowadzenia przytacza wybrane dane literaturowe dotyczące enzymów proteolitycznych i ich inhibitorów oraz informacje dotyczące wykorzystania inhibitorów proteaz w medycynie. Zamieszczone we wprowadzeniu informacje dobrze uzasadniają celowość podjętych przez Doktorantkę badań.

Przejrzyste i jasne ujęcie tematu wskazuje, iż Doktorantka bardzo dobrze zapoznała się z omawianymi zagadnieniami i potrafi wiedzę syntetyzować oraz jasno przekazać. Niewątpliwie ważnym dodatkiem do tej części pracy są profesjonalnie przygotowane ryciny, które ułatwiają zrozumienie omawianych zagadnień.

Literatura omawianych zagadnień została starannie dobrana tematycznie i w przeważającej części pochodzi z ostatnich 10 lat.

Metodyka badań została szczegółowo opisana na 20 stronach rozprawy. Cel pracy jest sformułowany jasno i dobrze uzasadnia podjęte badania. Opis metodyki badań jest rzetelny i dokładny. Wskazuje na samodzielność wykonanej pracy, a także na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych.

Sposób przedstawienia wyników nie budzi większych zastrzeżeń. Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła na 34 rycinach i w 26 tabelach.

W rozdziale „Dyskusja” Autorka w bardzo przejrzysty sposób podsumowuje założenia i w oparciu o prawidłowo dobrane piśmiennictwo krytycznie analizuje wyniki przeprowadzonych badań. Rozprawę kończy akapit podsumowujący całą pracę i wytyczający kierunki przyszłych badań. Po nim następuje spis literatury zawierający pokaźną liczbę 218 pozycji literaturowych.

Wyniki badań opisywane w rozprawie doktorskiej były przedmiotem czterech projektów naukowych kierowanych przez Doktorantkę, trzech publikacji i dziesięciu prezentacji konferencyjnych.

Ponadto mgr Katarzyna Szałapata jest współautorem 5 publikacji recenzowanych w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports, jednego rozdziału w monografii w języku angielskim, pracy pogładowej w Postęпах Biochemii i czterech rozdziałów w monografiach w języku polskim. Podkreślić należy, że mgr Katarzyna Szałapata w latach 2015-2018 kierowała projektem PRELUDIUM dla osób rozpoczynających karierę naukową finansowanym przez NCN.

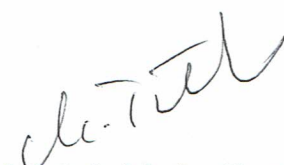
Poniżej wymienię uwagi krytyczne które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

1. Tytuł rozprawy nie w pełni odzwierciedla jej zawartość. Tytuł mówi tylko o charakterystyce wybranych biomateriałów modyfikowanych inhibitorami proteaz, podczas gdy Doktorantka musiała najpierw opracować metody ich wytwarzania (co nie było łatwe), a dopiero potem mogła badać ich właściwości.
2. Niewiele informacji o inhibitorze sojowym.
3. Na części rycin nie zaznaczono odchylenia standardowego.
4. Legendy do części rycin są na tyle skąpe, że trudno szybko zinterpretować pokazane wyniki.
5. Pomiar spadku aktywności trypsyny wykorzystywany w pracy do oceny zdolności hamujących inhibitorów proteaz immobilizowanych na biomateriałach może dawać artefakty. Pomiar prowadzi się w silnie alkalicznym (niefizjologicznym) pH. Ponadto *in vivo* w miejscu implantacji raczej nie oczekujemy obecności trypsyny. Można go jednak potraktować (z uwagi na niski koszt) jako badanie wstępne i uzupełnić innym testem.
6. Określenie „aktywność inhibicji” jest zdaniem oceniającego niezręczne, można zastąpić je sformułowaniem „zdolność do hamowania” lub „potencjał hamujący”.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne, w głównej mierze mające charakter marginalny lub polemiczny, jedynie w niewielkim stopniu obniżają bardzo wysoką ogólną ocenę przedstawionej rozprawy.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Katarzyny Szałapaty pt. „Właściwości wybranych materiałów biomedycznych modyfikowanych inhibitorami enzymów proteolitycznych” stanowi oryginalne opracowanie naukowe, poruszające zaawansowane zagadnienia projektowania nowych biomateriałów. Praca spełnia wymogi formalne i warunki określone w *art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)* i na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej z wnioskiem o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Katarzyny Szałapaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom recenzowanej rozprawy oraz dorobek naukowy Autorki, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Marian Tomasiak