

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 63 23  
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Wrocław 2.10.2023

Prof. dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska  
Zakład Mikrobiologii  
Wydział Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej  
pt. **„Synteza nowych materiałów na bazie chitozanu oraz ich wybrane zastosowania w biotechnologii i medycynie”**

Mgr Monika Sikora

Praca doktorska wykonana na Uniwersytecie Jana Kochanowskiego w Kielcach  
w Szkole Doktorskiej Sekcji Nauki Ścisłe i Przyrodnicze  
w dyscyplinie Nauki Biologiczne

Promotor: dr hab. Michał Arabski, prof. UJK  
Promotor pomocniczy: dr Maria Wiśniewska-Wrona

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań nad syntezą, charakterystyką fizykochemiczną i oceną właściwości biologicznych biomateriałów na bazie chitozanu, celem zastosowania ich do oczyszczania rekombinowanych białek fagowych pozyskanych w procesie biotechnologicznym oraz zastosowania biomateriałów jako nośników dla bakteriofagów. Badania realizowano w ramach projektu: „Akcelerator Rozwoju Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, POWR, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Praca doktorska ma układ typowy dla eksperymentalnych rozpraw doktorskich. W pracy wyróżniono: *Wprowadzenie*, rozdziały dotyczące części teoretycznej pracy (*Właściwości biologiczne chitozanu o znaczeniu medycznym; Wybrane zastosowanie praktyczne chitozanu*), *Uzasadnienie podjęcia tematu, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Streszczenie* w języku polskim i angielskim, *Bibliografię* oraz *Wykaz skrótów i oznaczeń*. Dodatkowo Doktorantka umieściła w pracy spis swojego dorobku naukowego.

W części teoretycznej rozprawy Doktorantka przedstawiła charakterystykę fizykochemiczną chitozanu jego właściwości biologiczne, w tym jego aktywność przeciwdrobnoustrojową. Autorka omówiła także chitozan jako przeciwutleniacz. Z punktu widzenia tematyki pracy doktorskiej przedstawione zostały także zagadnienia dotyczące właściwości przeciwzapalnych, przeciwnowotworowych i hemostatycznych chitozanu oraz



zagadnienie dotyczące oczyszczania białek rekombinowanych. Ciekawym rozdziałem jest ten omawiający wybrane praktyczne zastosowania chitozanu zarówno w biologii, jak i medycynie. Rozdział przedstawiający teoretyczne wiadomości dotyczące zakresu rozprawy doktorskiej jest napisany ciekawie, zawiera wiele cennych informacji i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do realizacji rozprawy doktorskiej.

Pytania i komentarze do części teoretycznej pracy:

- Czy obecność lizozymu w płynach ustrojowych organizmów wyższych, może wpłynąć ograniczająco na możliwości zastosowania w praktyce opatrunków na bazie chitozanu?
- Czy biorąc pod uwagę mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej chitozanu można spodziewać się rozwoju oporności na ten biopolimer wśród drobnoustrojów? Autorka rozprawy nie porusza tego ważnego zagadnienia w kontekście omawianych właściwości biologicznych chitozanu;
- Uwaga dotycząca nomenklatury: prawidłowy zapis to: *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Minnesota, gdyż są to serowary, a nie nazwy gatunkowe, więc zapisujemy je z dużej litery i bez kursywy;
- Jakie struktury, wskazane na stronie 15 dysertacji, które ma tworzyć LPS z białkami i fosfolipidami w błonie zewnętrznej Doktorantka ma na myśli?

W dysertacji Doktorantka bardzo dobrze przedstawia uzasadnienie podjęcia tematu, wskazując na potrzebę poszukiwania nowych biopolimerów do zastosowań praktycznych w medycynie. W pełni zgadzam się z argumentacją Doktorantki w tym zakresie. W obszarze badawczym Doktorantki znalazł się chitozan, związek o ciekawych właściwościach biologicznych, chemicznych, biozgodny, nietoksyczny dla organizmów wyższych i biodegradowalny. Biozgodność jest niezwykle pożądaną cechą materiałów wykorzystywanych w medycynie. Zatem wybór chitozanu do badań w niniejszej pracy doktorskiej jest wyborem uzasadnionym.

W pierwszej części pracy Doktorantka zaplanowała syntezę matryc na bazie chitozanu, następnie dokonała ich oceny właściwości fizykochemicznych. W kolejnym kroku wybrała odpowiednią matrycę do dalszych badań nad jej oddziaływaniem z LPS. W badaniach ważnym etapem było określenie cytotoxycywności matryc celem ich zastosowania do procesu oczyszczania białek fagowych (tj. endolizyny i depolimerazy), a także zastosowania wybranej matrycy w postaci błony, jako opatrunku zawierającego

bakteriofagi bójcze wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Wyznaczone cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

*Materiały i metody* zostały zasadniczo dobrze przygotowane. Doktorantka w tym rozdziale przygotowała czytelne opisy, schematy i tabele. Autorka w dysertacji wykazała się znajomością wielu różnorodnych metod badawczych m.in. obliczeniowych, statystycznych, spektrofotometrycznych, wiskozymetrycznych, syntezy chemicznej, mikroskopowych, a także metod mikrobiologicznych oraz metod biologii molekularnej, m.in. metodyka testu LAL, badania aktywności przeciwbakteryjnej, oczyszczanie rekombinowanych białek fagowych i ich rozdział techniką SDS-PAGE czy badania toksyczności biopolimerów z zastosowaniem linii komórkowych. Doktorantka wykonała także badanie aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych. W odniesieniu do metodyki zastosowanej do badania matryc polimerowych wykonano analizy ich cytotoxyczności, analizy struktury, analizy uwalniania z nich bakteriofagów z wykorzystaniem interferometrii laserowej. Należy podkreślić i wyróżnić, iż dzięki doborowi tak różnorodnych metod praca zyskała na interdyscyplinarności. Wybrane do badań fagi były to fagi lityczne, specyficzne dla *P. aeruginosa* PAO1, różniące się klasyfikacją taksonomiczną, specyficznością receptora i wielkością wirionu.

Pytania i komentarze do rozdziału *Materiały i Metody*:

- Dla części metodyki Autorka podaje odpowiednie cytowania literaturowe, dla innych nie ma takich odniesień, czy zatem wśród opisanych metod są metody autorskie Doktorantki lub własne modyfikacje dostępnych metod? Jeśli tak, to które?
- W porównaniu do dokładności opisu metodyki poszczególnych rozdziałów w pracy, opracowanie dotyczące rozdziału elektroforetycznego białek fagowych metodą SDS-PAGE jest przedstawione niezwykle skromnie (brak opisu m.in. składu buforów czy przygotowania żeli, chyba że Doktorantka korzystała z gotowych zestawów komercyjnych? Jeśli tak, to powinno to być zaznaczone w tekście).

*Wyniki* przedstawione są czytelnie. Precyzyjnie udokumentowane są poszczególne etapy pracy, jakie zostały wykonane. Autorka w pierwszej części omawia wyniki dotyczące uzyskanych parametrów fizykochemicznych i czystości mikrobiologicznej chitozanów. Warto zaznaczyć, iż ta część badań została przeprowadzona we współpracy międzynarodowej. Przygotowane do dalszych badań formy chitozanów w formie granulatu i gąbki także poddawano ocenie parametrów fizykochemicznych (wtórne pęcznienie, zawartość polimeru, średnia masa cząsteczkowa) oraz wytrzymałości użytkowej tj. wytrzymałości chemicznej oraz mechanicznej. Ta część pracy jest bardzo cenna ze względu

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 63 23  
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

na fakt, iż chitozan jako polimer pozyskiwany z zasobów naturalnych może wykazywać różnice między poszczególnymi próbkami. Finalnie, matrycą spełniającą oczekiwane wymagania tj. mechaniczną odporność na uszkodzenia, była Matrix 3, przygotowana z mikrokrystalicznego chitozanu. Dla Matrix 3 wykonano testy na zdolność pęcznienia, morfologię powierzchni, zdolność do uwalniania bakteriofagów i interakcji fagów z matrycą. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobrze wykonana dokumentacja fotograficzna wykonana techniką SEM dla matrycy chitozanowej w formie granulatu, matrycy chitozanowej w formie gąbki oraz Matrix 3. W kręgu zainteresowań Doktorantki było wykonanie oczyszczania rekombinowanych białek fagowych endolizyny oraz depolimerazy z LPS obecnego w roztworze, z użyciem wcześniej zaprojektowanych i wykonanych matryc. Doktorantka oceniła wychwytywanie LPS przez zastosowane matryce w postaci gąbki i granulek, a następnie dokonała wyboru tych, które charakteryzowały się największą zdolnością wychwytywania endotoksyny. W pracy przeprowadzono także ocenę aktywności enzymatycznej oczyszczonych z użyciem wybranych wcześniej matryc, rekombinowanych białek fagowych. Ważnym krokiem było także przeprowadzenie analizy cytotoksyczności matryc wybranych do testów. Bardzo interesującą częścią pracy są wyniki pokazujące stworzenie opatrunku chitozanowego modyfikowanego trzema fagami. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka zaproponowała dwa modele interakcji fagów z matrycami, natomiast w testach mikrobiologicznych wykazała, iż fagi osadzone w biokompozycie Matrix 3 wykazują silne właściwości bakterioobójcze wobec *P. aeruginosa* PAO1.

Pytania i komentarze do części *Wyniki*:

- W tabeli 9, opisującej wariant badanej gąbki polimerowej, nie podano zawartości % gliceryny?
- Jak przygotowano kontrolę pozytywną LPS w teście LAL?
- W pracy przeprowadzono także ocenę aktywności enzymatycznej oczyszczonych białek fagowych. Na bazie jakiej metodyki zastosowano do badań enzymatycznych dwie różne metody? Czym różni się Rycina 14 A i B?

W *Dyskusji*, Autorka przeprowadza analizę i dyskutuje uzyskane wyniki z wynikami innych autorów. *Dyskusja* pod względem merytorycznym napisana jest w sposób prawidłowy, niemniej część tekstu ma formę wniosków i powinna być umieszczona właśnie w rozdziale *Wnioski*, który jest bardzo skromny, choć Doktorantka uzyskała wiele bardzo ciekawych i cennych wyników. Otrzymane przez Doktorantkę wyniki mają duży aspekt aplikacyjności. Wyniki wskazują, że otrzymane matryce polimerowe nie wykazują działania

cytotoksycznego na linii komórkowe ludzkiego nabłonka podstawnego grucznoraka A549, co może być pozytywną wskazówką do zastosowań medycznych. Dodatkowo, do ważnych osiągnięć pracy zaliczam fakt, że biopolimery w postaci granulek oraz gąbki nie zmniejszają aktywności biologicznej depolimerazy. Dodatkowo podkreślić należy dużą skuteczność matrycy na bazie chitozanu w granulkach do oczyszczania preparatu depolimerazy z pozostałości LPS w próbie badanej. Połączenie badań nad poszukiwaniem nowych biomateriałów z ich wykorzystaniem w terapii fagowej (biokompozyty antybakteryjne) jest podejściem bardzo innowacyjnym oraz bardzo aktualnym. Badania objęte niniejszą rozprawą doktorską są także istotne w kontekście globalnego problemu antybiotykooporności bakterii, gdzie poszukiwanie metod alternatywnych w leczeniu jest obecnie koniecznością. W tym ujęciu tematykę pracy doktorskiej uznać należy za bardzo aktualną. Stworzony prototyp opatrunku na bazie chitozanu, jak wykazuje w pracy Doktorantka, ma skuteczne właściwości absorpcji wody, także w formie z dodatkiem fagów. Połączenie chitozanu z bakteriofagami, wykazującego właściwości antybakteryjne wobec *P. aeruginosa* jest bardzo innowacyjnym pomysłem. Za ważny wynik uzyskany dla tej części badań uważam także wykazanie wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej wobec *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 matrycy biopolimerowej Matrix 3 z wszystkimi trzema testowanymi fagami. Doktorantce udało się otrzymać film chitozanowy, który pozytywnie wiązał fagi ze strukturą wytworzonej matrycy.

- Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki kieruję do Doktorantki pytanie dotyczące przyszłości zapoczątkowanych w niniejszej pracy badań? Jakie Doktorantka widzi perspektywy oraz czy Doktorantka dostrzega jakieś zagrożenia w zastosowaniu opatrunków chitozanowych z dodatkiem bakteriofagów?

Cała rozprawa doktorska napisana jest ciekawie, czyta się ją bardzo dobrze. Autorka nie uniknęła niestety niezręczności językowych, czy skrótów myślowych, które z obowiązku Recenzentki wskazuję: „redukcja drobnoustrojów”, „inserty hodowlane”, „warianty badano w wersji mokrej po przepłukaniu z kąpieli koagulacyjnej”, „poziom LPS w białkach”, „separacja elektroforetyczna”, „redukcja liczby kolonii w powyższych sześciu logach”. Wskazane niedociągnięcia językowe nie umniejszają jednak walorom naukowym pracy i jej wartości poznawczej.

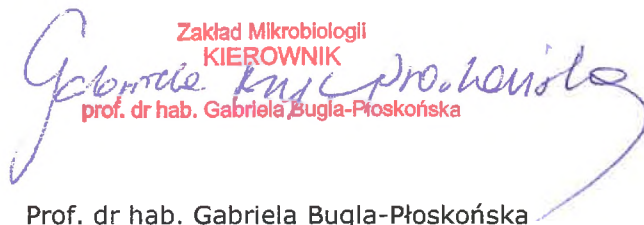
W dysertacji mgr Monika Sikora przedstawiła także swój dotychczasowy dorobek naukowy oraz organizacyjny. Doktorantka jest współautorką 3 publikacji naukowych, 9 zgłoszeń konferencyjnych, brała aktywny udział w 10 projektach badawczych, jest także Autorką dwóch zgłoszeń patentowych, które są wynikiem przeprowadzonych badań w

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63  
51-148 Wrocław  
tel. +48 71 375 63 23  
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

ramach niniejszej pracy doktorskiej. Aktywność naukową i organizacyjną Doktorantki uznać należy za wyróżniającą się.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Moniki Sikory, pt. **„Synteza nowych materiałów na bazie chitozanu oraz ich wybrane zastosowania w biotechnologii i medycynie”** spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim określone w artykułe 187 Ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Doktorantka wykazała się znajomością wielu technik badawczych i uzyskała bardzo interesujące wyniki wnoszące nowe dane do dyscypliny nauki biologiczne. Zwracam się także do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na wysokie walory naukowe rozprawy oraz możliwości zastosowań aplikacyjnych.

Zakład Mikrobiologii  
KIEROWNIK  
  
prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska

Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska