



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

dr hab. inż. Sławomir Kadłubowski, prof. uczelni

Łódź, 26 lipca 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak, doktorantki w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, pod tytułem „*Procesy rodnikowe w kolagenie inicjowane radiacyjnie i ich makroskopowe konsekwencje*”; promotor: dr hab. Hanna Lewandowska-Siwkiewicz; promotor pomocniczy: dr inż. Jarosław Sadło

Praca doktorska pani mgr Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak ma charakter badań podstawowych nad wpływem promieniowania jonizującego na kolagen i jego podstawowe składniki (wybrane aminokwasy) oraz bezkomórkową matrycę skóry ludzkiej. Widoczne jest tu powiązanie rozważań nad obserwowanymi przemianami fizycznymi i chemicznymi w napromieniowanym materiale z możliwością praktycznego wykorzystania otrzymanych wyników w badaniach nad sterylizacją radiacyjną przeszczepów ludzkiej skóry. Badania przeprowadzone w ramach tej pracy mają zatem bardzo szeroki charakter – od badań na związkach modelowych (aminokwasy) oraz wybrany rodzaj kolagenu aż po próbę wyznaczenia optymalnych parametrów sterylizacji bezkomórkowych rusztowań ludzkiej skóry. Imponującym jest, że Autorce udało się zbadać wpływ promieniowania na wybrane materiały dla wielu zmiennych parametrów prowadzenia procesu, takich jak: dawka, wilgotność, obecność tlenu.

Zagadnienia, których dotyczy rozprawa pani mgr Dąbrowskiej-Gralak, są bardzo aktualne, a także ważne zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, to jest zbadania wpływu promieniowania jonizującego na kolagen, jak i ich praktycznym zastosowaniem jako materiałów używanych w przeszczepach ludzkiej skóry.

Na podkreślenie zasługuje nie tylko pomysł, ale również fakt, że praca p. mgr Dąbrowskiej-Gralak jest obszerna, wielowątkowa i oparta na szerokiej palecie metod badawczych. W efekcie uzyskano wielowymiarowy obraz badanych zagadnień niewątpliwie przybliżający nas do ich praktycznego zastosowania. Wyniki uzyskane w tej pracy stały się podstawą czterech publikacji w dobrych czasopismach naukowych (trzy z nich znajdują się na liście JRC) a także dwóch wystąpień na konferencjach.

Wyniki stanowiące pracę doktorską pani mgr Dąbrowskiej-Gralak otrzymane zostały w ramach projektu NCBiR „Opracowanie innowacyjnej metody leczenia Epidermolysis Bullosa oraz ran przewlekłych innego pochodzenia za pomocą opatrunku biologicznego z materiału ludzkiego”.



Przedstawiona do oceny praca doktorska ma klasyczny charakter. Po wykazie stosowanych skrótów i symboli, wstępie i jasno określonym celu pracy (z wyodrębnionymi czterema zadaniami badawczymi) następuje wielowątkowy wstęp literaturowy. Wskazane w nim zostały podstawowe informacje dotyczące biopolimerów (w tym białek i kolagenu), trzech wybranych aminokwasów oraz rusztowań tkankowych opartych na kolagenie wykorzystywanych jako materiał szkieletowy w inżynierii skóry. Druga część wprowadzenia literaturowego to opis oddziaływań promieniowania jonizującego z materią. Dalej następują wyjaśnienie znaczenia wody w kolagenie, podstaw sterylizacji radiacyjnej oraz opisy używanych technik eksperymentalnych. Z punktu widzenia czytelnika zabrakło mi (szczególnie w ostatniej części wprowadzenia literaturowego) informacji co już wiadomo np. na temat wykorzystania techniki EPR w badaniach nad kolagenem czy aminokwasami (powróć do tego jeszcze później).

Część eksperymentalna zawiera szczegółowy opis przygotowania próbek do pomiarów i ich charakterystyki. Doktorantka wyjaśniła także potrzebę prowadzenia analizy statystycznej ANOVA.

Znaczną część pracy stanowi opis wyników badań (48 stron) zakończony ich dyskusją oraz wyciągniętymi z pracy wnioskami. Pracę doktorską kończą wykaz cytowanej literatury, streszczenie, abstrakt i załącznik.

Najważniejsze osiągnięcia pracy można streścić następująco:

1. Zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na wybrane aminokwasy stanowiące podstawowe składowe kolagenu
2. Wskazanie skutków działania promieniowania jonizującego na kolagen typu I i bezkomórkowe matryce ludzkiej skóry
3. Analiza warunków prowadzenia procesu sterylizacji (takich jak dawka, obecność tlenu i wilgotność) na zmianę właściwości fizyko-chemicznych napromienianych materiałów ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju powstających rodników metodą EPR.

Praca została zaplanowana i napisana w sposób dojrzały, obserwowane efekty są poddane analizie i interpretacji. Autorka udowodniła ponad wszelką wątpliwość, że opanowała w swojej dziedzinie obszerny warsztat badacza, posiadała umiejętność formułowania celów badawczych i dobierania do nich odpowiednich technik, analizy i interpretacji złożonych, zbiorów wyników, ich krytycznej analizy i formułowania wniosków. Opanowała także umiejętność pisania prac naukowych w sposób zarazem precyzyjny i klarowny. Praca jest dobrze napisana, dojrzałym, sprawnym i poprawnym językiem. Czyta się ją z przyjemnością.

Nie znalazłem w tej pracy istotnych błędów merytorycznych. Ale, jak w każdej pracy naukowej, tak i tu można znaleźć pewne elementy do dyskusji, czy też wskazać na pewne niedopowiedzenia czy niejasności.

Moim zdaniem, zagadnieniami, które mogłyby wymagać poszerzenia, uzupełnienia czy dyskusji są przede wszystkim następujące kwestie.



1. Doktorantka w ramach pracy doktorskiej za cel postawiła sobie zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na bezkomórkowe matryce ludzkiej skóry których głównym składnikiem jest kolagen. Przed analizą właściwego materiału skupiła się na wybranych związkach modelowych (aminokwasach) będących podstawowym budulcem badanego biopolimeru. Podejście takie, na co chciałbym zwrócić uwagę, charakteryzuje doświadczonych badaczy. Należy jednak zwrócić uwagę iż materiały te (glicyna, prolina i hydroksypolina) były już szczegółowo badane i w literaturze znaleźć można szereg informacji o wpływie promieniowania jonizującego na wybrane aminokwasy (także wyniki badań metodą EPR np. Sinclair J., ESR Study of Irradiated Glycine at Low Temperatures, Journal of Chemical Physics, 55, 245-251, 1971). Podobnie jest w przypadku kolagenu. Już w 1964 Bailey i Tromans badali wpływ promieniowania jonizującego na kolagen wskazując na znaczne zmiany we właściwościach fizycznych mimo niewielkich zmian w strukturze chemicznej. Szkoda że w pracy nie zostało to wystarczająco pokazane. Dla przykładu we wstępie literaturowym jedynie dla hydroksypolicy znaleźć można informację „Rodniki hydroksypolicy posiadają wiele konformerów, co powoduje dużą trudność w interpretacji widm EPR”. Także w opisie otrzymanych wyników badań ich dyskusja z danymi literaturowymi mogłaby być mniej oszczędna. Albo, jeśli otrzymane dane na to wskazują, należałoby podkreślić nowości czy różnice w otrzymanych wynikach. W znaczny sposób podniosłoby to jakość recenzowanej pracy.

Powyzsza uwaga dotyczy również dyskusji wyników badań metodami TGA czy DSC. Jestem przekonany że doktorantka szczegółowo przeszledziła literaturę w tym zakresie, warto by zatem poświęcić temu nieco więcej miejsca.

2. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem rozdział 3.1.4 dotyczący możliwości kowalencyjnego sieciowania kolagenu oraz wyniki przedstawione w rozdziale 5.4. Badania nad możliwością tworzenia trwałych połączeń w kolagenie prowadzone są już od lat 60tych ubiegłego wieku (między innymi Bailey A. J., Rhodes D. N., Cater C. W., Radiation Research, 22, 606-621, 1964). Dane eksperymentalne wskazują wyłącznie na zachodząca reakcję pęknięcia łańcucha polimeru i wynikające z tego obniżenie średniej masy cząsteczkowej. Efekt ten jest bardzo wyraźny i zależny od dawki. Dlatego trudno jest mi się zgodzić ze stwierdzeniem przedstawionym we wnioskach, że „dawka ma niewielki wpływ na właściwości fizykochemiczne”. Może gdyby użyć innych technik, np. dynamicznego rozpraszania światła (czyli pomiaru rozmiaru makrocząsteczek) efekt ten byłby jeszcze bardziej wyraźny. Szerzej należałoby także rozwinąć stwierdzenie, że „badane dawki do 50kGy włącznie nie wprowadzają zmian, które prowadziłyby do pogorszenia przydatności badanego materiału do przeszczepu”. Czy chodzi tu Autorce o właściwości mechaniczne? Niestety takie nie były w pracy analizowane.

3. Autorka celnie wskazuje na potencjalny charakter aplikacyjny prowadzonych badań. W obliczu przedstawionych wyników, szczególnie dotyczących zmiany masy cząsteczkowej, zabrakło jednak szerszej próby dyskusji (poza informacją o sterylizacji w warunkach beztlenowych) o czynnikach które mogły by powstrzymać lub zapobiec niekorzystnym zmianom parametrów fizyko-chemicznych napromieniowanego kolagenu.



Wymienione wyżej zagadnienia w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy p. mgr Dąbrowska-Gralak i są jedynie próbą spojrzenia na przedstawione wyniki z innego punktu widzenia.

Żadna praca o tej objętości i stopniu skomplikowania nie jest wolna od pewnych usterek czy drobnych niedopowiedzeń. Obowiązek recenzenta nakazuje mi o nich wspomnieć:

- cel pracy (strona 15) wydaje się być jasny jednakże, nie znając jeszcze jej pełnych wyników, zastanawiać się można nad nowością naukową otrzymanych wyników czy rozwiązań praktycznych,
- wstęp literaturowy (strona 22): mimo że pracę cechuje przejrzysta szata graficzna należałoby zwrócić większą uwagę na jakość rysunków i przetłumaczenie ich na język polski, przykładem niedopracowania może być rysunek 3, 5 itd,
- wstęp literaturowy (strona 27) zrozumiałym jest że w pracy o tak znacznej objętości zdarzają się powtórzenia, jednakże warto ich unikać, przykładem może być kilkukrotnie powtórzona informacja o podstawowych właściwościach czy pochodzeniu kolagenu,
- wstęp literaturowy (strona 30) określenie „intensywność promieniowania” wydaje się być mało zrozumiałe,
- wstęp literaturowy (strona 34) w punkcie 3.2.1 „Chemia radiacyjna aminokwasów i białek” wiele miejsca poświęcono reakcjom z rodnikiem hydroksylowym, co z pozostałymi produktami radiolizy wody: wodorem atomowym czy uwodnionym elektronem?
- wstęp literaturowy (strona 36) w punkcie 3.2.1.2 przeczytać można o „rozpuszczalności tlenu w polimerze”. Jaka jest rozpuszczalność tlenu w kolagenie?
- wstęp literaturowy (strona 41) w punkcie 3.2.2 Autorka pisze o małym prawdopodobieństwie spotkania dwóch rodników w przypadku napromieniania z niską szybkością dawkowania. Nie mogę się zgodzić z takim stwierdzeniem. Sieciowanie międzycząsteczkowe prowadzące do syntezy makroskopowych hydrożeli prowadzone jest przecież właśnie w takich warunkach.

We wspomnianym wyżej punkcie zabrakło wpływu stężenia polimeru na właściwości otrzymywanego produktu.

- wstęp literaturowy (strona 49): Autorka pisze o faktach wynikających z rysunku, co oczywiście nie ma miejsca,
- wstęp literaturowy (strona 55): na wyróżnienie zasługuje szczegółowy opis podstaw techniki EPR, brakuje jednak wskazania co na temat aminokwasów, kolagenu i ich badania techniką EPR mówi literatura naukowa. Podobna uwaga skierowana jest do opisów pozostałych technik badawczych,
- część eksperymentalna (strona 64) zabrakło informacji o szybkości dawkowania dla strumienia elektronów. Czy można taką wartość wyznaczyć?
- wyniki (punkt 5.1.1) przedstawione zostały zmiany widm EPR poszczególnych aminokwasów w czasie, niestety zabrakło próby opracowania kinetyki



zaniku rodników. Docenić należy że badania takie przeprowadzone zostały dla kolagenu,

- wyniki (strona 111) w punkcie 5.4 przedstawione zostały wyniki badan metodą elektroforezy żelowej. Autorka pisze, że w skład kolagenu wchodzi łańcuchy beta o masie cząsteczkowej 209 kDa. Wielkość ta została zaczerpnięta z literatury. Szkoda że nie użyto standardów o wyższych masach cząsteczkowych. Można by wtedy tą informację potwierdzić,

- wyniki (strona 114) punkt 5.6: czy zaobserwowano powstawanie wiązań podwójnych C=C wynikających z procesu degradacji polimeru?

- znaleziono szereg literówek, miejscami brakuje znaków interpunkcyjnych, spotkać można też żargon laboratoryjny czy skróty myślowe,

- niestety część rysunków jest zbyt mała by można je było z łatwością oglądać i czytać. Ich nieznaczne powiększenie lub zwiększenie rozmiaru czcionki opisów znacznie by w tym pomogło,

- sposób sformatowania spisu bibliografii jest nieco niekonsekwentny. Przy wskazywaniu stron internetowych brakuje daty.

Chciałabym podkreślić, że wymienione wyżej uwagi krytyczne mają drugorzędne znaczenie i w żadnej mierze nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska pani mgr Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak jest aktualna, ciekawa i wartościowa, stoi na wysokim poziomie i zawiera elementy nowości naukowej, które przydałoby się jedynie bardziej podkreślić. Doktorantka wykazała się znajomością przedmiotu, właściwego planowania badań z wykorzystaniem bogatego wachlarza metod doświadczalnych i naukowych, twórczej ale jednocześnie krytycznej interpretacji i oceny wyników oraz biegłością w pisaniu prac naukowych.

Stwierdzam, że **przedstawiona rozprawa doktorska spełnia formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim przedstawione w Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie Wyższym i Nauce, i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

dr hab. inż. Sławomir Kadłubowski, profesor uczelni

