



Prof. dr hab. Alina Sionkowska
Katedra Chemii Biomateriałów i Kosmetyków
Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
alinas@umk.pl

Toruń, dnia 25 lipca 2023r.

R e c e n z j a
rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak
pt. „Procesy rodnikowe w kolagenie inicjowane radiacyjnie i ich makroskopowe
konsekwencje”
wykonanej w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

Przedstawiona do recenzji praca wykonana została w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Hanny Lewandowskiej-Siwkiewicz oraz dr inż. Jarosława Sadło jako promotora pomocniczego.

Celem pracy było zbadanie procesów rodnikowych w kolagenie powstałych na skutek działania promieniowania jonizującego oraz ocena wybranych właściwości fizykochemicznych kolagenu jakie następują podczas procesu sterylizacji.

Materiały kolagenowe są bardzo szeroko stosowane w medycynie i kosmetologii i zawsze przed wprowadzeniem materiału na rynek pojawia się problem sterylizacji. Wiadomo, że po sterylizacji radiacyjnej materiał nie tylko ulega wyjąłowieniu, ale bardzo często dochodzi do zmian we właściwościach fizykochemicznych, które są następstwem reakcji rodnikowych. Badanie reakcji rodnikowych w skomplikowanych układach białkowych ze względu na mnogość grup bocznych oraz oddziaływań bliskiego i dalekiego zasięgu nie należy do łatwych. W kolagenie występują struktury wyższych rzędów, które również są wrażliwe na działanie promieniowania i ich modyfikacje mogą prowadzić do zmian biologicznych białka, w tym nawet do nieodwracalnej denaturacji. Dodatkowo na przebieg procesów rodnikowych w kolagenie mogą wpływać takie parametry jak wilgotność próbki, pochodzenie kolagenu czy nawet sposób jego obróbki. Bezkomórkowe matryce kolagenowe pochodzenia ludzkiego są szczególnie ważne ze względu na możliwość ich potencjalnego zastosowania jako materiału do przeszczepów. Autorka obok celu naukowego postawiła sobie również cel aplikacyjny, jakim było wyznaczenie optymalnych parametrów i warunków dla procesu sterylizacji bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry. Cel pracy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak uważam za aktualny i ciekawy.

AS

Praca zawarta jest na 161 stronach. Podzielona jest na rozdziały wg ogólnie przyjętego schematu: wstęp, cel pracy, wstęp literaturowy, część eksperymentalna, wyniki i ich dyskusja, wnioski, literatura (198 pozycji) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wstęp literaturowy stanowią 43 strony, część eksperymentalną 8 stron, natomiast wyniki i dyskusja zawarte są na 57 stronach. Cytowana literatura jest stosowna do opisywanej tematyki, zawiera zarówno pozycje z ostatnich lat jak i te nieco starsze.

We wprowadzeniu Autorka omawia ogólnie biopolimery i nieco bardziej szczegółowo kolagen oraz podstawowe aminokwasy wchodzące w skład struktury kolagenu, czyli glicynę, prolinę i hydroksyprolinę. Dokonuje krótkiego przeglądu wiązań sieciujących w kolagenie oraz metod sieciowania kolagenu pod kątem zastosowania w inżynierii biomateriałowej. W tej części opisane są ogólnie procesy rodnikowe w organizmach żywych oraz chemia radiacyjna aminokwasów i białek. Następnie, w części literaturowej, Autorka omawia proces radiolizy wody, charakteryzuje powstałe rodniki oraz ich rolę w reakcjach rodnikowych w kolagenie. Doktorantka dokonała przeglądu literatury przedmiotu ze szczególnym naciskiem na rodniki w glicynie, prolinie i hydroksyprolinie. Cytowana literatura dotycząca badań procesów rodnikowych świadczy o tym, że Autorka zapoznała się z nowoczesnymi trendami w tej tematyce.

Podstawowym celem pracy było zbadanie procesów rodnikowych w kolagenie powstałych na skutek działania promieniowania jonizującego oraz ocena jakie zmiany we właściwościach fizykochemicznych kolagenu następują podczas procesu sterylizacji.

Cel ten Autorka realizowała poprzez badania porównawcze prowadzone dla kolagenu modelowego typu I pochodzenia bydłowego i bezkomórkowych matryc ludzkiej skóry oraz podstawowych aminokwasów występujących w strukturze kolagenu. W celu pracy postanowiono, że badany będzie wpływ różnych dawek promieniowania na wybrane właściwości kolagenu, aby ustalić dawkę optymalną. Celem podrzędnym było również przeanalizowanie wpływu wilgotności próbki na badany materiał podczas procesu sterylizacji.

Otrzymane wyniki wskazują, że postawiony cel pracy Autorka osiągnęła. W ramach pracy doktorskiej dokonano porównania reakcji rodnikowych w kolagenie modelowym i bezkomórkowych matrycach ludzkiej skóry, przeanalizowano wpływ wilgotności na procesy radiacyjne w kolagenie oraz dla porównania wykonano badania rodników tworzących się na podstawowych aminokwasach budujących strukturę pierwszorzędową kolagenu.

Po dokładnym przeczytaniu rozprawy doktorskiej nasuwają się pytania, które powinny być głębiej przedyskutowane:

1. W części teoretycznej zabrakło przeglądu literatury dotyczącej przemian radiacyjnych w różnych typach kolagenu, a chociażby ze względu na różny skład aminokwasowy różnice mogą być znaczące.

2. Na str. 27 Autorka napisała, że kolagen jest białkiem nierozpuszczalnym. Istnieją jednak rozpuszczalne formy kolagenu. Proszę o rozwinięcie tego problemu w czasie obrony rozprawy doktorskiej.
3. Elastyczność skóry nadaje głównie elastyna, kolagen nadaje wytrzymałość. Czym różnią się te dwa białka i jaka jest ich rola w budowie skóry ludzkiej? Czy bezkomórkowe matryce ludzkiej skóry mogły zawierać również elastynę?
4. Dlaczego wybrano dawki 28, 56, 81, 106, 131 Gy? W pracy tylko częściowo wyjaśniono niektóre powody. Inną dawką napromieniano aminokwasy i inną kolagen do badań termicznych (str. 90-91). Jaki był powód?
5. Czy rozważano pomiary DSC przy innych szybkościach grzania niż 10 stopni na minutę? Ogólnie wiadomo, że im wolniejsze jest grzanie tym więcej efektów można zaobserwować.
6. Str. 71, rys 19: na jakiej podstawie postulowana jest struktura rodnika GII – jest to rodnik obdarzony ładunkiem.
7. Str. 93 – wymienione są liczby, których nie można znaleźć w tabelach 5 i 6, do których jest odwołanie w tekście. Prośba o wyjaśnienie pochodzenia tych liczb.
8. Str. 106: Skóra ludzka jest materiałem trudnym do badań ze względu na niejednorodność. W jakim stopniu można uogólniać otrzymane wyniki i wyciągać wnioski ogólne?
9. Str. 115: czy obserwowano przesunięcia pasm na widmach IR kolagenu? W dysertacji nie wspomina się, czy pasma ulegały przesunięciom po napromienieniu.
10. Czy na rys. 55 i 54 (str. 116-117) zastosowano takie same powiększenia?
11. Dyskusja przedstawiona na stronach 122-129 stanowi bardziej podsumowanie wyników osiągniętych w czasie realizacji pracy doktorskiej i pozostawia pewien niedosyt.
12. Na str. 125 można znaleźć informacje, że przeprowadzono również w ramach współpracy badania biologiczne. Czy można przedstawić ich krótki zarys?
13. Str. 128 – porównanie wilgotnego kolagenu do „mokrych włosów” jest dość niefortunne. Włosy w zewnętrznej strukturze posiadają łuski, których nie mają fibryle i włókna kolagenowe. Prośba o rozbudowanie tego porównania i uzasadnienie podobieństw.
14. Czy porównywanie właściwości kolagenu różnego pochodzenia, w różnej formie, o różnym rozwinięciu powierzchni jest zasadne? Kolagen skóry ludzkiej i kolagen bydlęcy mogą różnić się zawartością hydroksyproliny. Czy próbowano znaleźć w literaturze skład aminokwasowy kolagenu skóry ludzkiej i kolagenu bydlęcego?

Inne uwagi:

1. Dlaczego tytuł pracy oraz pozycje w spisie literatury są w cudzysłowie?
2. Skrót DTG wyjaśniony jako "krzywa różniczkowa" jest niekompletny, powinien być zgodny z nazwą podaną na str. 56
3. Odwołanie na str. 20 do rys. 1 dotyczące potrójnej helisy jest niefortunne, na tym rysunku nie ma potrójnej helisy.
4. Str. 21 – nie tylko mostki disiarczkowe odpowiadają za tworzenie potrójnej helisy.
5. Mało czytelne są niektóre rysunki, np. rys. 4, rys. 5, rys. 10,
6. Na str. 32 powinno być w tekście rys 6 (jest rys. 7),
7. Str. 39, powinno być „Bailey”, jest „Baily”.
8. Str. 40, niejasne zdanie „Wraz ze wzrostem dawki degradacji towarzyszy tworzenie się wolnych aminokwasów”.
9. Na str. 75, rys. 23, struktura rodnika proliny – ładunek dodatni powinien być na atomie azotu, a nie na atomie wodoru (podobna sytuacja jest na rys. 26).

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że postawione przeze mnie pytania i uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Doktorantka zrealizowała postawiony cel pracy i uzyskała ciekawe wyniki. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy można zaliczyć:

1. Próbę zrozumienia powstawania uszkodzeń radiacyjnych w kolagenie w czasie sterylizacji
2. Zbadanie wpływu działania promieniowania na kolagen w bezkomórkowych matrycach ludzkiej skóry
3. Określenie stopnia fragmentacji materiału kolagenowego w zależności od dawki
4. Ustalenie warunków sterylizacji radiacyjnej dla badanych matryc ludzkiej skóry.

Biorąc pod uwagę całość badań, oryginalność i jakość wyników a także ich dyskusję uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązującą ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym (ustawa z 2018 roku - Prawo szkolnictwie wyższym i nauce). Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Dąbrowskiej-Gralak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Alina Sionkowska