



**Dr hab. inż. Marek Ochowiak, prof. uczelni**  
**WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ**  
**Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej**  
ul. Berdychowo 4, 61-131 Poznań, tel. +48 61 665 2789  
e-mail: [marek.ochowiak@put.poznan.pl](mailto:marek.ochowiak@put.poznan.pl), [www.put.poznan.pl](http://www.put.poznan.pl)

Poznań, 28 lipca 2022 roku

## **RECENZJA**

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej

**pt. „Odpowiedź fibroblastów na obecność biofilmów tworzonych przez patogeny izolowane z przewlekłych owrzodzeń żylnych”.**

Podstawą prawną sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo Pana Prof. dr hab. inż. Rafała Rakoczego – dziekana Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, z dnia 8 lipca 2022 roku informujące o powołaniu przez Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej.

Doktorat wdrożeniowy to program Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, obecnie Ministerstwa Edukacji i Nauki, uruchomiony w 2017 roku prowadzący do uzyskania stopnia doktora poprzez przygotowanie rozprawy doktorskiej, łączącej zarówno teoretyczny jak i praktyczny wymiar badań. Program Doktoratu Wdrożeniowego realizowany jest poprzez prowadzenie w ramach szkół doktorskich kształcenia doktorantów we współpracy z zatrudniającymi ich przedsiębiorcami albo innymi podmiotami. Daje on zatem możliwość uzyskania stopnia naukowego osobom, które jednocześnie chcą w pełni kontynuować pracę zawodową poza uczelnią. Stanowi zatem swoistego rodzaju pomost pomiędzy karierą w nauce i biznesie. Jest to zarazem szansa na wdrożenie i komercjalizację otrzymanych wyników badań, dedykowanych dla konkretnego podmiotu czy branży. Przygotowywane w jego ramach dysertacje stanowią nie tylko oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ale także podstawę zastosowania będącego jego wynikiem wdrożenia w praktyce gospodarczej. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w ramach I edycji projektu Doktorat Wdrożeniowy finansowanego ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr 29/DW/2017). Praca doktorska wykonana została pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Agaty Markowskiej-Szczupak, prof. ZUT oraz promotora pomocniczego dra hab. Adama Feliksa Junki, prof. UMW.

## 1. Treść i zakres rozprawy

Rany przewlekłe definiuje się jako rany, które nie przechodzą przez fazy gojenia w sposób uporządkowany i terminowy. Rany przewlekłe stanowią duże obciążenie, zarówno dla pacjenta, jak i dla systemu opieki zdrowotnej. Są one nie tylko przyczyną obniżenia jakości życia osoby chorej, ale w skrajnych przypadkach mogą prowadzić do amputacji kończyn, a nawet zgonu. Z danych literaturowych wynika, że rany przewlekłe występują u 2,21 na 1000 osób, a częstość występowania ran przewlekłych nóg występują u 1,51 na 1000 osób. Najbardziej narażone na ich występowanie są osoby w wieku podeszłym, ponieważ skutek procesu starzenia się organizmu dochodzi do upośledzenia procesu gojenia się ran. Jednym z głównych czynników prowadzących do opóźnienia procesu gojenia rany jest rozwój biofilmu drobnoustrojów, które kolonizują ranę, ale mogą również wywołać infekcję ogólnoustrojową. Leczenie ran przewlekłych jest trudne i należy zastosować metodę holistyczną zakładającą, że leczyć należy zarówno ciało, jak i duszę pacjenta, zaś poprawa w jednym obszarze życia przynosi również poprawę w innych obszarach. Personel medyczny zajmujący się pacjentem z raną przewlekłą musi posiadać umiejętności praktyczne, kompetencje oraz przede wszystkim wiedzę w tej dziedzinie.

W nawiązaniu do powyższego uznano, że bardzo ważne jest przeprowadzenie badań infekcji wywoływanej przez biofilmy drobnoustrojów oraz poszukiwanie biomarkerów infekcji w oparciu o model *in vitro*. Niniejsze badania są w szczególności próbą lepszego poznania opisanych w pracy infekcji oraz opracowanie wdrożenia pozwalającego na szybką diagnostykę owrzodzeń, które przyczynić się może do poprawy jakości życia pacjentów. Praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej już na pierwszy rzut oka robi dobre wrażenie, jest ciekawa, dobrze napisana i zredagowana, ma klasyczny i przejrzysty układ, zawiera bogatą literaturę przedmiotu, głównie pochodzącą z ostatnich lat.

Celem rozprawy doktorskiej była analiza metabolomiczna i genetyczna infekcji wywoływanej przez biofilmy drobnoustrojów izolowanych z przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni oraz poszukiwanie biomarkerów infekcji w oparciu o model *in vitro*. Szczegółowe cele badawcze obejmowały:

- Analizę procesu tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro* przez trzy szczepy patogenne drobnoustrojów *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oraz *Candida albicans* w oparciu o metody mikrobiologii klasycznej, mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii SEM;
- Opracowanie metody kohodowli komórek prawidłowych fibroblastów tkanki łącznej L929 z badanymi patogenami, stanowiącej model infekcji rany przewlekłej *in vitro*;
- Analizę wpływu patogenów na żywotność fibroblastów oraz określenie kluczowego punktu infekcji tzw. punktu krytycznej kolonizacji;
- Analizę zmian metabolicznych indukowanych poprzez interakcję gospodarz-patogen, obejmującą badanie metabolitów zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych, wydzielanych w czasie infekcji *in vitro*;
- Analizę zmian w ekspresji genów zaangażowanych w proces tworzenia biofilmu przez poszczególne patogeny oraz ekspresji genów odpowiedzialnych za przebieg procesu

apoptozy w komórkach fibroblastów w odpowiedzi na obecność patogenów izolowanych z przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni;

- Przygotowanie wdrożenia biomarkera/biomarkerów pozwalających na szybką diagnostykę przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni.

Wyróżniającymi się ośrodkami badawczymi zajmującymi się tym zagadnieniem są z całą pewnością Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny oraz Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Autorka opiniowanej rozprawy postawiła sobie ambitne zadanie przeprowadzić kompleksową analizę metabolomiczną i genetyczną infekcji wywołanej przez wspomniane wcześniej biofilmy oraz poszukiwanie biomarkerów infekcji. Wymagało to zaplanowania i zrealizowania obszernego programu badawczego obejmującego zastosowanie wielu nowoczesnych metod badawczych. W mojej ocenie najtrudniejszym etapem było wyeksponowanie praktycznego aspektu badań tj. przygotowanie wdrożenia.

Przedstawiona rozprawa doktorska dotyczy ważnej, ze względów poznawczych i praktycznych, problematyki ran przewlekłych, infekcji, owrzodzeń. Obecnie, bardzo szerokim spektrum nauki w ramach nowoczesnych rozwiązań materiałowych jest poszukiwanie nowych biomarkerów (markery fizjologiczne – ocena przepływu i wartości pH krwi, stężenie tlenu tkankowego, wyniki durometryczne, ekstensometryczne i ultrasonograficzne, markery tkankowe – stopień infekcji rany oraz poziom epitelializacji) oraz biodegradowalnych i aktywnych opatrunków. Aktualnie personel medyczny ma bardzo ograniczony dostęp do metod umożliwiających szybką, niezawodną i tanią identyfikację, zarówno mikroorganizmów, jak i formy w jakiej one występują w ranie. Prawidłowe rozpoznanie czynników infekcji mogłoby by się przyczynić do zatrzymania rozwoju zakażenia, bez poważnych konsekwencji dla zdrowia i życia pacjenta.

Rozprawa doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz powinna wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną Autora w danej dziedzinie jak i umiejętności samodzielnelnego prowadzenia pracy naukowej. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę charakter projektu Doktorat Wdrożeniowy, w ramach którego niniejsza rozprawa została przygotowana. Uważam, że najważniejsze wymogi spełnia zarówno recenzowana praca, jak i Kandydatka na doktora. Rozprawa ma charakter pracy metodologicznej ukierunkowanej na opracowanie nowego systemu opartego na technice spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) do identyfikacji metabolitów, które mogłyby zostać implementowane jako markery, związanej z obecnością biofilmu infekcji ran.

Rozprawa została przedstawiona w postaci 204 stronicowej monografii. Przedstawioną do recenzji pracę, składającą się z 5 rozdziałów, podzielić można na dwie zasadnicze części: część teoretyczną (rozdział 1) oraz część doświadczalną (rozdziały 2 – 5). Całość poprzedza wykaz ważniejszych stosowanych symboli i akronimów oraz krótkie wprowadzenie. Kończą natomiast streszczenie pracy w językach polskim i angielskim oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa. Autorka zamieściła ponadto w rozprawie swój dorobek naukowy. Praca zawiera również wykaz tabel i rysunków. Tytuł rozprawy oddaje w pełni jej zawartość. Niespełna dwustronicowy wstęp oraz sformułowane hipotezy badawcze wprowadzają czytelnika w

analizowane zagadnienia i w sposób bardzo jasny przedstawiają konieczność podjęcia proponowanych przez Autorkę badań. Część teoretyczna przedstawia studia literaturowe dotyczące analizowanego zagadnienia. Opisano w niej rany przewlekłe, tworzenie biofilmów oraz diagnostykę i zwalczanie infekcji ran przewlekłych. Część doświadczalna omawia szeroko i szczegółowo metody badawcze, oraz wyniki badań doświadczalnych. Rozdział ten jest najobszerniejszy. Nie będę streszczać przeprowadzonych badań, sam ich zakres jest dość szeroki, a liczba duża. Wszystkie prezentowane przez Doktorantkę wyniki badań są dobrze udokumentowane z wykorzystaniem tabel oraz rysunków. Wszystkie rysunki w pracy zostały przygotowane dość starannie, a ich jakość nie budzi zastrzeżeń. Rozdział 5 podsumowuje uzyskane wyniki badań oraz przedstawia prawidłowo sformułowane wnioski. Na końcu pracy Doktorantka zawarła spis literatury. Przedstawiony przegląd literatury obejmuje aż 286 pozycji literaturowych, w ogromnej większości z ostatniej dekady. Zrobiony jest on bardzo szczegółowo i w pełni odzwierciedla złożoność problemu, jakim zajęła się Doktorantka. Pokazuje również rozwój koncepcji naukowych związanych z badanym zagadnieniem. Tak liczny zbiór cytowanych prac dowodzi ogromnego nakładu pracy Doktorantki, która umiejętnie wybrała oraz przejrzyście przedstawiła najważniejsze zagadnienia w części teoretycznej rozprawy. Podsumowując tę część pracy stwierdzić należy, że Autorka zarówno dobrze przygotowała się teoretycznie do zaplanowanych badań, jak też dobrze uzasadnia konieczność podjęcia tego rodzaju badań. Doktorantka wnosi znaczący element nowości naukowej w obecny stan wiedzy, a przeprowadzone badania odznaczają się oryginalnością i mają duży potencjał w aspekcie ich zastosowania w praktyce.

Cenną umiejętnością Autorki jest zwięzłe formułowanie myśli, brak przerostu formy nad treścią oraz jasne formułowanie wniosków i prezentowanie wyników prowadzonych badań. Przedstawiona do recenzji praca napisana jest poprawnym językiem polskim. Praca zredagowana jest starannie, ale nie jest wolna od drobnych błędów edytorskich. Poniżej przedstawiam kilka wybranych z dostrzeżonych przeze mnie tego rodzaju niezręczności:

- „Rysunek” - pisany dużą literą, czasami małą, niekiedy skrótowo „Rys.”, podobna uwaga dotyczy zwrotu „Tabela”);
- Nieprawidłowe użycie łącznika np. str. 18, 138, myślnik (inaczej pauza) jest znakiem interpunkcyjnym, zaś łącznik to znak graficzny, a odróżniają je zarówno długość, jak i zasady użycia. Myślnik jest przede wszystkim dłuższy: „—”, a ponieważ jest znakiem międzywyrazowym, powinien być wydzielony odstępami od wyrazów, pomiędzy którymi występuje. Łącznik to najkrótsza z „kresek”, tzw. znak wewnątrzwyrazowy: „-”.
- str. 26, 41, 76, 80, 86, w różnych miejscach wstawiono „kropki”, których nie powinno tam być;
- str. 137, 139, brak „kropki”, „przecinka”, „średnika”;
- str. 36, niewłaściwe użycie „przecinka” przed cytowaną literaturą;
- str. 40, 71, 111, 127, brak spacji;
- rys. 7, przydałaby się skala z jednostką metryczną;

- str. 65-66, ...710,0 do 1,180  $\mu\text{m}$ ... czy na pewno? Dokładność zapisu i brak przecinka (zapewne zapożyczony z wersji anglojęzycznej) dałby wartości, w mojej opinii, prawidłowe tj. od 710 do 1180  $\mu\text{m}$ ;
- np. str. 87, 88, 89, 102, 119, 120, 123, puste miejsca, których można było uniknąć;
- str. 97, Na rysunku 34 A, B przedstawiono wyniki analizy żywotności kokultury fibroblastów... są tylko rysunki A i B, zatem wystarczyłoby podać, że na rysunku 34 przedstawiono...
- np. str. 105, 106, użycie jednostki „godziny” i zamiennie „h”, lepiej używać tego samego słowa/skrótu w całej pracy;
- ko-kultury, czy kokultury – różny zapis w pracy;
- różny sposób zapisu cytowanej literatury w treści pracy (w stylu: [236], [237], [238], [239], [240], [241], lub [237]-[252]).

## **2. Ocena merytoryczna rozprawy – uwagi ogólne**

Zasadnicza część pracy poświęcona realizacji postawionego celu jest jej bardzo mocną stroną. Zadeklarowany cel pracy jest w znacznym stopniu wynikiem zainteresowań badawczych i dokonań Autorki rozprawy, jak też twórczą kontynuacją badań prowadzonych przez zespoły kierowane przez Panią dr hab. inż. Agaty Markowskiej-Szczupak, prof. ZUT oraz Pana dra hab. Adama Feliksa Junki, prof. UMW. Przeprowadzone badania dowodzą, że zastosowanie spektroskopii NMR pozwala na rozróżnienie form drobnoustrojów. Zaproponowany model eksperymentalny, łączący dwa rodzaje komórek (drobnoustroje i fibroblasty), mógłby zostać wykorzystany do oceny wpływu zastosowanych terapeutyków zarówno na gospodarza, jak i na patogeny. Znając biomarker świadczący o zakażeniu określonym szczepem bakterii, z zastosowaniem metaboliki celowanej możliwe byłoby opracowanie testu diagnostycznego pozwalającego określić rodzaj infekcji. Technika tak mogłaby stanowić alternatywę dla standardowych czasowo- i kosztochłonnych metod diagnostyki i umożliwić stałe monitorowanie stanu rany. Otrzymane w niniejszej rozprawie wyniki mogą zostać wykorzystane do przygotowania schematu postępowania, który może być wdrożony do ogólnego stosowania w laboratoriach diagnostycznych. Oczywiście wydaje się być kwestia czasu i kolejnych kilkunastu lat dalszych badań i prób klinicznych niezbędnych do pełnego zaimplementowania opracowanego modelu. Należy podkreślić, że przedstawiona tematyka rozprawy doktorskiej wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej analizowanego zagadnienia przez co wypełnia istniejącą lukę informacyjną, dlatego podjęte działanie badawcze uważam za w pełni uzasadnione, nie tylko z punktu widzenia nauki, ale również z punktu widzenia osoby chorej.

Stwierdzam, że Pani mgr inż. Joanna Czajkowska zrealizowała zadeklarowane cele pracy, a uzyskane z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych wyniki – uznaję za wkład w rozwój prac badawczych związanych z szeroko rozumianymi ranami przewlekłymi. Na uwagę zasługuje fakt, że uzyskane wyniki mają duże znaczenie praktyczne, a przedstawiona do recenzji praca ma charakter interdyscyplinarny. Do głównych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

- określenie metabolitów wydzielanych zewnątrzkomórkowo i wewnątrzkomórkowo przez drobnoustroje i komórki fibroblastów, które można uznać za markery zakażenia rany, co stanowi główne elementy wdrożenia, którego realizacja zależy jednak od uwarunkowań związanych z istniejącymi przepisami prawa i obowiązującymi programami leczenia ran przewlekłych w Polsce,
- zastosowanie opracowanego modelu infekcji rany przewlekłej in vitro do badań nad aktywnością antyseptyków jest przygotowane do implementacji jako element oferty komercyjnego Laboratorium Mikrobiologii w Centrum Diagnostyki Populacyjnej Łukasiewicz – PORT.

### 3. Ocena strony formalnej rozprawy – uwagi szczegółowe

Recenzowaną rozprawę czyta się z zainteresowaniem, jest poprawna językowo i praktycznie wolna od błędów natury edytorskiej. Praca jest dobrze napisana i zredagowana oraz ma przejrzysty, logiczny i wyczerpujący układ. Drugą grupę stanowią uwagi o charakterze merytorycznym, na które oczekuję wyjaśnień Doktorantki podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii i zdać parę pytań:

- W tym miejscu chciałbym zwrócić jednak uwagę na jedną kwestię. Dążenie do jak najwyższych wartości dokładności, skuteczności i wiarygodności jest istotne, jednakże należy pamiętać, aby zachować umiar. Dotyczy ono m.in. następujących sformułowań: „Najwyższy poziom ekspresji wykazano dla genu fimB (ekspresja względem genu referencyjnego równa 532,51) w 16 h od wprowadzenia inokulum bakterii E. coli. Poziom ten gwałtownie się obniżył (wartość 0,89 względem genu referencyjnego) po 24 godzinach kohodowli...” oraz „Zaobserwowano silną ekspresję genu csrA w 16 h kohodowli E. coli z komórkami fibroblastów (52,95 razy wyższa względem genu referencyjnego) oraz znaczące obniżenie jego ekspresji (0,69 razy wyższa względem genu referencyjnego) w 24 h prowadzenia kohodowli” (str. 140, 141, 142, 143). Co według Doktorantki miało na celu tak dokładne podawanie danych? We wcześniejszych opisach Doktorantka stosuje zwroty „ponad” i „około”. Czy jest to statystycznie uzasadnione?
- Czy Doktorantka mogłaby przedstawić szacunkowe koszty inwestycyjne opracowanej techniki? Jak mają się one do aktualnie stosowanych technik diagnostycznych?
- czy opracowany model infekcji rany przewlekłej in vitro do badań nad aktywnością antyseptyków, który został przygotowany do implementacji jako element oferty komercyjnego Laboratorium Mikrobiologii w Centrum Diagnostyki Populacyjnej Łukasiewicz – PORT ma szansę na „pełne wdrożenie” w przedsiębiorstwie? Czy jest on ogólnodostępny, czy tylko wyłącznie dla pracodawcy (z udziałem którego niniejszy doktorat wdrożeniowy został przygotowany)?
- Personel medyczny zajmujący się pacjentem z raną przewlekłą musi posiadać umiejętności praktyczne, kompetencje oraz przede wszystkim wiedzę w tej dziedzinie – czy w przypadku zaproponowanej techniki personel musiałby zostać dodatkowo przeszkolony? Czy może Pani przedstawić swoją opinię na ten temat?

Powyższe uwagi, poczynione z obowiązku recenzenta, w najmniejszym stopniu nie podważają wartości poznawczej i aplikacyjnej rozprawy, a stanowią jedynie podstawę do merytorycznej dyskusji podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. W mojej opinii przedstawiony w rozprawie materiał spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

#### **4. Podsumowanie i wnioski końcowe**

Uwzględniając aktualność podjętej tematyki rozprawy, trafność zdefiniowanego celu oraz poprawność wnioskowania, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską pt. „Odpowiedź fibroblastów na obecność biofilmów tworzonych przez patogeny izolowane z przewlekłych owrzodzeń żylnych”. Złożoność problemów z jakimi spotkała się Doktorantka realizując recenzowaną rozprawę, a także ich interdyscyplinarność, niewątpliwie wymagała wiedzy teoretycznej i praktycznej niezbędnej do prowadzenia badań eksperymentalnych oraz ogromnego nakładu pracy. Sposób zaplanowania i prowadzenia badań, jak również forma przedstawienia uzyskanych wyników oraz ich analiza świadczą o dużej wiedzy oraz kompetencjach. Uważam, że Doktorantka zrealizowała założone cele swojej pracy.

**Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska jest opracowaniem oryginalnym o wysokiej wartości poznawczej. Uważam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez obowiązującą aktualnie w Polsce Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

POLITECHNIKA POZNAŃSKA  
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ  
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ

DR HAB. INŻ. MAREK OCHOWIAK, PROF. UCZELNI  
KIEROWNIK ZAKŁADU INŻYNIERII I APARATURY CHEMICZNEJ

## **Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie**

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Czajkowskiej

**pt. „Odpowiedź fibroblastów na obecność biofilmów tworzonych przez patogeny izolowane z przewlekłych owrzodzeń żylnych”.**

Uważam, że ze względu na istotne elementy nowości naukowej, pomyślnie zrealizowany bardzo obszerny program badawczy, przejrzysty sposób opracowania dużej liczby uzyskanych wyników oraz duże ich znaczenie praktyczne praca zasługuje na wyróżnienie. Na podkreślenie zasługuje również bogaty dorobek publikacyjny Autorki obejmujący 11 publikacji. Wartość indeksu Hirscha wynosi 7, a całkowita liczba cytowań 89. Jest to więc duży pod względem liczbowym i wartościowy pod względem merytorycznym dorobek.

POLITECHNIKA POZNAŃSKA  
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ  
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ

DR HAB. INŻ. MAREK OCHOWIAK, PROF. UCZELNI  
KIEROWNIK ZAKŁADU INŻYNIERII I APARATURY CHEMICZNEJ