

Szczecin 1 sierpnia, 2018

Prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak
Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Ocena pracy doktorskiej p. mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony
p.t.: „**Badania nad opracowaniem funkcjonalnych biokompozytów polimerowych do leczenia ran**”

wykonanej w Instytucie Polimerów ZUT w Szczecinie
pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Mirosławy El Fray

Podstawą opracowania oceny jest:

- pismo Pana Dziekana Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej prof. dr hab. inż. Ryszarda Kaleńczuka (WTiICH/A/166/2019) z dnia 30 maj 2019 roku, który na wniosek Rady Wydziału TiCh ZUT zwrócił się do mnie o dokonanie recenzji ww. pracy doktorskiej;
- praca doktorska mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony

W okresie ostatnich kilkunastu lat można zaobserwować wzrastające zainteresowanie wykorzystaniem biomateriałów do różnego rodzaju zastosowań jako alternatywy do obecnie produkowanych materiałów syntetycznych otrzymywanych w wyniku przetwórstwa ropy naftowej, gazu ziemnego lub węgla. Jedną z grup takich bioproduktów są polimery bioodnawialne (tzw. biopolimery), które są chętnie wykorzystywane szczególnie w dziedzinach, gdzie istotne jest to, aby otrzymane materiały spełniały określone funkcje użytkowe w środowisku naturalnym przy zachowaniu biokompatybilności oraz swojego biodegradowalnego charakteru. W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na nowoczesne materiały opatrunkowe jakie spełniają wiele funkcji w tym zapewniają ochronę i skuteczne leczenie odleżyn w różnych stopniach ich zaawansowania a jednocześnie pełnią rolę nośnika różnych substancji leczniczych istnieje konieczność poszukiwania wielofunkcyjnych opatrunków wykonanych z materiałów pochodzenia biologicznego o zdefiniowanych właściwościach sorpcyjnych, mechanicznych, biomedycznych w tym stymulujących procesy gojenia się ran.

Dlatego uważam wybór tematu pracy, mający na celu opracowanie funkcjonalnych biokompozytów polimerowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie do wytwarzania dedykowanych materiałów opatrunkowych wytworzonych na bazie odpowiednio dobranych biopolimerów, w formie

jedno-, dwu- i trójwarstwowych filmów, stanowiących nośnik dla substancji farmakologicznych o działaniu przeciwbólowym (lidokalina i chlorowoderek lidokaliny), przeciwbakteryjnym (sulfanilamid i chloramfenikol) i przeciwzapalnym (siarczan cynku), jako celowy i trafny z punktu widzenia oryginalności pracy badawczej, gdzie przykładem tego rodzaju pracy jest rozprawa doktorska p. mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 217 stron i została podzielona po wprowadzeniu obejmującym streszczenie, indeks symboli i oznaczeń stosowanych w pracy na 6 zasadniczych części: część literaturową obejmującą przegląd literatury, wydzieloną część opisującą cel i zakres pracy, część eksperymentalną, wyniki badań i dyskusja, następnie podsumowanie najważniejszych otrzymanych wyników wraz z wnioskami oraz na zakończenie spis literatury. Dodatkowo w aneksie zestawiono wybrane tabele i rysunki oraz spis wszystkich tabel i rysunków oraz dorobek naukowy doktorantki. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań badawczo-naukowych.

Doktorantka w wprowadzeniu opisuje i podkreśla złożoność tematyki związanej z otrzymywaniem dedykowanych biokompozytów w postaci cienkich filmów z wykorzystaniem naturalnych biopolimerów. Wybór trzech biopolimerów z grupy polisacharydów takich jak chitozan, alginian i sól sodowa karboksymetylo celulozy uważam za trafny ze względu z jednej strony na ich ogólną dostępność i potwierdzone zdolności tworzenia filmów w procesie wylewania roztworów wodnych oraz z drugiej na specyficzne właściwości biologiczne wykazane we wcześniejszych pracach nie tylko innych autorów ale także samej Doktorantki takich jak wysoka biogodność, biodegradowalność, zdolność przyspieszania procesu gojenia ran, zdolność stymulacji procesów odpornościowych człowieka, właściwości bakteriobójcze i bakteriostatyczne.

Wykorzystanie surowców odpadowych w postaci chitozanu otrzymywanej w procesie deacetylacji z naturalnie występującej chityny np. w pancerzach skorupiaków i owadów do otrzymywania funkcjonalnych materiałów jest tematyką w jakiej specjalizują się od wielu lat pracownicy Instytut Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi, gdzie pracuje mgr inż. Maria Wiśniewska-Wrona i dlatego nie dziwi mnie wybór tego surowca jako dodatkowego materiału obok alginianu i karboksymetylo celulozy do wytwarzania opatrunków biomedycznych.

Właściwa „Część teoretyczna” licząca 40 stron jest zwięzłą próbą zaprezentowania obecnego stanu wiedzy i genezy wyboru celu pracy w świetle zgromadzonej literatury. Wszystko rozpoczyna opis spotykanych ran odleżynowych, ich podział oraz omówienie procesu ich gojenia się. Doktorantka wymieniła oraz opisała obecnie produkowane i stosowane opatrunki z ich

podziałem ze względu na rodzaj wykorzystanego materiału nośnikowego oraz charakter fizyczny utworzonej matrycy w tym tych aktywnych spełniających obok ochrony mechanicznej dodatkowe funkcje np. posiadających zdolność uwalniania określonych substancji leczniczych. Wśród tych opartych o biopolimery znajduje się grupa opatrunków polisacharydowych zawierających alginian, które powinny być w pewnym sensie punktem odniesienia podczas analizy otrzymanych wyników. W kolejnej części zostały omówione transdermalne systemy terapeutyczne posiadające zdolność kontrolowanego uwalniania leków wraz z opisem skóry jako bariery organizmu w przenikaniu substancji aktywnych.

Całość jest zakończona prezentacją istotnych informacji dotyczących budowy chemicznej oraz właściwości fizyko-chemicznych w tym funkcjonalnych wybranych biopolimerów takich jak chitozan, alginian sodu oraz karboksymetylo celuloza oraz zastosowanych w pracy substancji leczniczych.

Niestety w przeglądzie literatury brakuje wydzielonego podpunktu dotyczącego stanu wiedzy na temat prac badawczych i wdrożeniowych dot. materiałów opatrunkowych na rany powierzchniowe w tym odleżynowe na bazie biokompozytów wykorzystujących różne polisacharydy w tym te jakie zostały wykorzystane w opisanych badaniach. Brak takiego punktu uniemożliwia jednoznaczne stwierdzenie na ile koncepcje zaprezentowane w celu i zakresie pracy są oryginalne.

W pracy brak odniesienia do licznych prac oryginalnych i przeglądowych innych autorów dotyczącej tej tematyki np.:

1. Willi Paul and Chandra P. Sharma (2004) Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review, Trends Biomater. Artif. Organs, 18(1), 18-23.
2. Aderibigbe B.A., Buyana B., (2018) Alginate in Wound Dressings (2018) Pharmaceutics; 10(2): 42
3. Liakos I, Rizzello L, Scurr DJ, Pompa PP, Bayer IS, Athanassiou A (2014), All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties, Int J Pharm., 463(2), 137-45
4. Sharma S., Sanpui P., Chattopadhyay A., Ghosh S.S. (2012) Fabrication of antibacterial silver nanoparticle-sodium alginate-chitosan composite films. RSC. Adv., 2, 5837–5843.
5. Dantas MD, Cavalcante DR, Araújo FE, Barretto SR, Aciole GT, Pinheiro AL, Ribeiro MA, Lima-Verde IB, Melo CM, Cardoso JC, Albuquerque Júnior RL (2011) Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy, J Photochem Photobiol; 105(1), 51-9.

6. Wang L. Khor E., Wee A., Yong L., Lim L.Y., (2002) Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing , Journal of Biomedical Materials Research, 63(5), 610-8

W pracy występuje brak informacji na temat produktów komercyjnych wykorzystujących anionowe polisacharydy m.in. o bazującym na chitozanie i alginianie komercyjnym opatrunku o nazwie Tromboguard®.

W oddzielnej części zaprezentowano cel pracy wraz z ogólnym przedstawieniem hipotezy badawczej oraz omówieniem zakresu pracy. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że według mnie zaproponowany temat pracy jest zbyt ogólny i nie oddaje rzeczywistego szczegółowego celu i zakresu pracy oraz specyfiki badanych układów biokompozytowych m.in. ze względu na użyty w tytule bardzo ogólny termin biokompozyt polimerowy zamiast bardziej adekwatnego biokompozyt polisacharydowy, który lepiej definiuje i doprecyzowuje zakres pracy doktorskiej.

Rozdział „Część eksperymentalna” liczy 29 stron i jest podzielony na 2 zasadnicze części: materiały i odczynniki oraz metody badawcze i analityczne wraz z szczegółowym opisem postępowania doświadczalnego, które zostało omówione w 22 sekcjach poświęconych kolejnym etapom zastosowanych metod modyfikacji i charakteryzacji fizyko-chemicznej biopolimerów, metodyki ich otrzymywania i badania właściwości fizyko-chemicznych w tym szczegółowych właściwości biologicznych. W wykazie zastosowanych odczynników zabrakło informacji o stopniu czystości i/lub przeznaczeniu wykorzystanych części odczynników i substancji np. tabela 7.7 na stronie 65. Metody analityczne zostały przyjęte w sposób prawidłowy adekwatnie do wskazanego zakresu i przedmiotu analizy. To samo dotyczy zastosowanych metod charakteryzacji właściwości otrzymanych materiałów biokompozytowych oraz badań biologicznych.

Dziwi brak opisu oraz zastosowania jakiegokolwiek metodyki analizy statystycznej wyników co w przypadku badań zarówno fizyko-chemicznych właściwości materiałów na bazie naturalnych polisacharydów o nie w pełni powtarzalnej strukturze chemicznej jak i stosowanych badań o charakterze biologicznym wydaje się być podstawą rzetelnej analizy otrzymanych wyników. Uważam, że taka analiza powinna być ostatecznie przeprowadzona aby zweryfikować i stwierdzić istotność obserwowanych i omawianych w pracy różnic.

W trakcie lektury części doświadczalnej oraz opisu wyników przeprowadzonych badań nasunęły mi następujące pytania i wątpliwości:

W punkcie 8.16 dot. otrzymywania biokompozytowych materiałów opatrunkowych z dodatkiem substancji aktywnych brak informacji w jaki sposób i na jakim etapie tworzenia materiałów opatrunkowych zarówno dwu- jak i trójskładnikowych wprowadzono je do układu i czy podczas tego procesu obserwowano jakieś istotne zmiany właściwości utworzonych roztworów/zawiesin wodnych oraz formowanych filmów?

Z czego wynikało zastosowanie wskazanych w pracy w pkt. 8.17 parametrów i warunków przygotowania filmów takich jak grubość wylewanej warstwy oraz warunki suszenia (czas i temperatura)? Jako, że takie warunki będą trudne do zastosowania w aplikacjach przemysłowych czy i jak taki proces mógłby być prowadzony w sposób ciągły w przemyśle?

Z czego wynikają wykazane duże różnice grubości otrzymanych filmów (w zakresie od 0,04-0,1 mm) (pkt. 8.19 str. 81) i czy nie można było tego w jakiś sposób lepiej kontrolować na etapie ich tworzenia i/lub procesu suszenia?

Do sterylizacji badanych próbek przed testami aktywności antymikrobiologicznej (pkt 8.22.1 str. 87) zastosowano naświetlanie promieniowaniem UV, jednakże nie podano warunków procesu sterylizacji (rodzaj promieniowania, urządzenie i czas sterylizacji) oraz nie potwierdzono czy sam ten proces nie wpłynął na właściwości fizyko-chemiczne badanych materiałów?

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że na bazie wybranej formy użytkowej chitozanu, wybranej soli kwasu alginianowego (sodowej, wapniowej lub mieszanej) oraz soli sodowej karboksymetylocelulozy można stworzyć materiał opatrunkowy w formie filmu o różnej strukturze warstwowej (jedno-, dwu- i trójwarstwowej), przeznaczony do leczenia trudno gojących się ran odleżynowych w trzech pierwszych fazach gojenia. Opracowane biokompozyty mogą stanowić nośnik substancji leczniczych o działaniu przeciwbólowym (lidokaina i chlorowodorek lidokainy), przeciwzapalnym (siarczan cynku) oraz przeciwbakteryjnym (sulfanilamid i chloramfenikol).

Wykorzystując rozmaite metody analityczne m.in metoda analizy termicznej (DSC), spektrofotometria w podczerwieni (FTIR), dynamiczna analiza termiczno-mechaniczną (DMTA) oraz metoda magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) zweryfikowano wpływ zmiennego udziału poszczególnych składników polimerowych (chitozanu, alginianu, pochodnej celulozy KMC) w materiale biokompozytowym oraz dodatku substancji aktywnych na budowę chemiczną i strukturę fazową wytworzonych materiałów opatrunkowych. Badania spektroskopowe NMR, spektroskopii FTIR oraz DSC przeprowadzone kolejno dla biokompozytów CH/ALG i CH/ALG/KMC zawierającego aktywne składniki farmakologiczne wskazały na złożony i niejednoznaczny charakter oddziaływań lidokainy, sulfanilamidu i siarczanu cynku z blendą polimerową.

Wyniki przeprowadzonych badań degradacji enzymatycznej potwierdziły, że w temperaturze ludzkiego ciała (w okresie do 7 dni), dwu- i trójskładnikowe filmy biokompozytowe ulegały istotnej degradacji enzymatycznej w zakresie 9-19% ubytku aminocukrów bez istotniejszego wpływu na strukturę materiału opatrunkowego. Pytanie czy sama forma zastosowanego chitozanu tzn. mikrokrystaliczna, mleczanowy czy klasyczna miała a jeżeli tak to jaki na właściwości otrzymanych biokompozytowych filmów. Doktorantka wykazała, że skład ilościowy opracowanych biokompozytów oraz jego cechy fizykochemiczne takie jak lipofilowość oraz struktura morfologiczna, w istotny sposób wpływają na szybkość uwalniania wprowadzonej substancji farmakologicznej oraz na ich właściwości fizyko-mechaniczne i użytkowe takie jak chłonność i zdolności sorpcyjne. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy potwierdzona eksperymentalnie wysoka szybkość uwalniania związków aktywnych z badanych matryc jest zadowalająca i optymalna z punktu widzenia tego rodzaju opatrunków?

Wytypowane materiały kompozytowe CH/ALG i CH/ALG/KMC z dodatkiem wybranego środka przeciwbakteryjnego (sulfanilamidu) lub środka przeciwbólowego (lidokainy) oraz preparaty nie zawierające tych substancji farmakologicznych nie wykazują działania cytotoksycznego w stosunku do modelowych mysich fibroblastów.

W pracy potwierdzono działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze modyfikowanych kompozytowych filmów wobec bakterii gram (-) *Escherichia coli* oraz działanie bakteriostatyczne wobec bakterii gram (+) *Staphylococcus aureus*. Co ciekawe potwierdzono także, że obecność samego chitozanu w badanych filmach wpływa pozytywnie na aktywność antymikrobiologiczną szczególnie w stosunku do bakterii gram (-).

„Podsumowanie wyników i wnioski” są zaprezentowane i sformułowane prawidłowo, adekwatnie do zakresu badań i otrzymanych wyników ze wskazaniem wszystkich najważniejszych właściwości poszczególnych otrzymanych w ramach pracy grup materiałów biokompozytowych.

Piśmiennictwo tzw. „Spis literatury” obejmuje 164 pozycji z okresu ostatnich 40 lat przy istotnym udziale publikacji autorów zagranicznych i nie budzi moich uwag poza wskazanymi brakami przytoczenia i odniesienia się do wyników innych autorów zajmujących się podobnymi polisacharydowymi materiałami opatrunkowymi.

W końcowej części pracy znajduje się wykaz bardzo bogatego dorobku naukowego Doktorantki obejmującego aż 58 publikacji oryginalnych z czego 2 ostatnie (poz. 57-58 opublikowane w czasopiśmie Polimery kolejno w roku 2018 i 2019 dotyczą wyników prac powiązanych bezpośrednio z wynikami pracy doktorskiej), 26 wystąpień na konferencjach międzynarodowych, 79 na

konferencjach i seminariach krajowych, 4 udzielone patenty i 13 zgłoszeń patentowych oraz udział aż w 20 projektach badawczo-rozwojowych finansowanych ze środków zewnętrznych. Fakt tak bogatego dorobku naukowego Doktorantki szczególnie w obszarze poznawczym i aplikacyjnym wymaga podkreślenia i wyróżnienia.

Od strony graficznej praca jest wykonana starannie, z czytelnymi tabelami oraz rysunkami. W pracy pojawiają się tylko nieliczne błędy interpunkcyjne często w postaci powtórzeń oraz nieprawidłowe określenia i tzw. „skrót myślowe”.

Wszystkie przytoczone powyżej uwagi wynikają z moich jako recenzenta wątpliwości oraz pytań do dyskusji w trakcie obrony pracy. Jednakże w tym miejscu chciałem podkreślić moją opinię na temat wysokiego poziomu merytorycznego pracy doktorskiej mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony.

Podsumowując: przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest bardzo trafną próbą poszukiwania właściwej struktury i doboru warunków procesu otrzymywania wybranych stabilnych biokompozytowych materiałów o różnej strukturze warstwowej wykorzystujących trzy różne biopolimery z grupy jonowych polisacharydów, które dzięki swoim ciekawym cechom funkcjonalnym mogą być wykorzystane samodzielnie lub w połączeniu z innymi substancjami bioaktywnymi stosowanymi w opatrunkach biomedycznych do leczenia odleżyn.

Takie zaproponowane produkty stanowią ciekawą alternatywę dla obecnie stosowanych materiałów opatrunkowych wykorzystywanych do leczenia ran odleżynowych na różnych etapach procesu gojenia. Praca ta jest ściśle związana z technologią chemiczną a konkretnie z poszukiwaniem nowych rozwiązań materiałowych na bazie biopolimerów w celu formowania produktów do potencjalnego zastosowania w przemyśle medycznym co zostało m.in. wykazane w ramach przedstawionej do oceny pracy.

Zaprezentowane ostateczne stwierdzenia i wnioski końcowe są interesujące z punktu widzenia poznawczego jak i technologicznego ze względu na przeprowadzenie badań dla trzech rodzajów zaproponowanych struktur materiałów oraz zastosowanych trzech grup substancji aktywnych typowo wykorzystywanych klinicznie w tego rodzaju opatrunkach. Jednocześnie otrzymane wyniki stymulują do dalszych badań związanych z poszukiwaniem dodatkowych substancji stabilizujących oraz właściwego dostosowania czy wręcz modyfikacji zastosowanych procesów jednostkowych jakie będą mogły spowodować wzrost stabilności i właściwości terapeutycznych otrzymanych materiałów zgodnie z oczekiwaniami i wymaganiami stawianymi w całym łańcuchu wartości w tym produkcyjnym.

Niniejszym po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą doktorską mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi formalne stawiane tego typu opracowaniom zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 (Dz. U. Nr 65, poz 595 z późniejszymi zm.) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym wnoszę do wysokiej Rady Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marii Wiśniewskiej-Wrony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

DYREKTOR
Centrum Bioinżynierii i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych

Prof. dr hab. inż. Artur Bartkowiak