



Lublin, 03.01.2022 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr **Adriany Muchowskiej**

pt. „Wpływ wybranych związków hybrydowych zaadsorbowanych na preparatach keratynowych”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska **mgr Adriany Muchowskiej** została wykonana pod kierunkiem promotora Pani Prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie oraz promotora pomocniczego Dr Piotra Kossona. Tematyka badawcza ocenianej pracy doktorskiej dotyczy oceny wpływu wytworzonych trzech typów opatrunków na proces gojenia się wyindukowanych ran u szczurów z wywołaną cukrzycą streptozotocynową.

Przedstawiona do recenzji Dysertacja doktorska stanowi opracowanie formatu A4, obejmujące 110 stron. Za wiera ona zalecany dla rozpraw doktorskich podział na części: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz ważniejszych skrótów i nazw używanych w pracy, Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski, Piśmiennictwo.

W części wstępnej pracy Doktorantka dokonała przeglądu piśmiennictwa naukowego dotyczącego ogólnej charakterystyki stopy cukrzycowej (w tym epidemiologia, powikłania i modeli rany cukrzycowej), fizjologii gojenia rany w tym cukrzycowej, leczenia trudno gojących się ran, w tym udział preparatów wspomagających leczenie. Wykorzystana bibliografia obejmuje znaczną ilość cytowań i uwzględnia najnowsze publikacje z obszaru badawczego Doktorantki. Po analizie bibliograficznej zauważyć można, że badania nad nowymi preparatami wspomagającymi gojenie ran są prowadzone w wielu ośrodkach naukowych. Jest to też powiązane z aktualną potrzebą medyczną – zauważalny jest wzrost liczby pacjentów z cukrzycą oraz wzrost powikłań związanych z tą chorobą, w tym ze stopą cukrzycową. Owrzodzenia w przypadku wymienionej stopy cukrzycowej stanowią duży problem medyczny ze względu na brak skutecznej metody leczenia, infekcje ran oraz częstość występowania. W kontekście powyższego, podjęcie prac badawczych nad tworzeniem preparatów opatrunkowych wspomagających leczenie trudno gojących się ran u cukrzyków,



było jak najbardziej słuszne, tym bardziej, że wyniki badawcze mogą mieć znaczenie praktyczne. Warto tu zaznaczyć, że Autorka we Wstępie wskazała neuropeptydy jako związki o potencjalnym działaniu wspomagającym gojenie ran, wymieniając i charakteryzując pokrótce Substancję P (11-peptyd wykazujący powinowactwo do receptorów neurokininowych) i bifalinę – syntetyczny peptyd opioidowy, będący analogiem enkefaliny. Tu wspomnieć należy, że bifalina została po raz pierwszy została zsyntezowana przez śp. prof. Andrzeja Lipkowskiego – wieloletniego Dyrektora Instytutu MDiK PAN i Kierownika Zakładu Neuropeptydów.

Podsumowując tę część manuskryptu, należy podkreślić właściwe dobranie treści wpisujących się w nurt zagadnień związanych z tworzeniem nowej generacji opatrunków do leczenia ran. Część przeglądowa dysertacji wskazuje, że Doktorantka dysponuje aktualną wiedzą z interesującego ją zakresu badawczego i oceniam to pozytywnie.

Następna, **eksperymentalna część dysertacji**, dotyczyła opisu przeprowadzenia eksperymentu w szczurzym modelu gojenia ran – wywołania cukrzycy, wyindukowania rany, obserwacji gojenia rany w kontakcie czasowym z preparatami opatrunkowymi oraz całościowej analizy uzyskanych rezultatów pod kątem wpływu testowanych preparatów na proces gojenia ran, w porównaniu do przypadków kontrolnych. Ponadto znalazł się w tej części krótki opis technik barwieniowych i immunochemicznych wykorzystanych do oceny histopatologicznej i immunohistochemicznej tkanek z obszaru rany. W eksperymentach wykorzystano 3 grupy kontrolne szczurów: szczury zdrowe z wyindukowaną raną bez opatrunku (kontrola pozytywna), szczury z cukrzycą, z wyindukowaną raną bez opatrunku (kontrola negatywna), oraz szczury z cukrzycą i z wyindukowaną raną i aplikacją maści Iruxol®mono (kontrola dodatkowa). Natomiast grupy badane stanowiły szczury z cukrzycą, z wyindukowaną raną: z opatrunkiem w postaci zasypki, którą stanowił sproszkowany preparat keratynowy; z opatrunkiem w postaci maści składającej się z preparatu keratynowego z zaadsorbowanym peptydem hybrydowym typu opioid-neurokinina (AWL3106) i lanoliny; oraz opatrunkiem w postaci maści, składającym się z preparatu keratynowego z zaadsorbowanym dimerycznym peptydem opioidowym (bifaliną) i lanoliną. Warto zaznaczyć, że Doktorantka wykorzystywała do swoich badań preparaty keratynowe uzyskane z wełny alpaki, przygotowane w Laboratorium Syntez Chemicznych Centrum Badań



Przedklinicznych i Technologii wg opatentowanej procedury opracowanej przez śp. Prof. Andrzeja Lipkowskiego.

Wyniki badań własnych objęły ocenę przebiegu procesu gojenia modelu rany u szczurów zdrowych w porównaniu do oceny procesu gojenia u szczurów z cukrzycą. Doktorantka w ocenie opierała się na analizie takich objawów jak: zapalenie, angiogeneza, proliferacja fibroblastów, włóknienie, naskórkowanie i zarastanie ubytków skóry. Na podstawie obserwacji powierzchni rany, badań histochemicznych materiału pobranego w trakcie gojenia ran w wyznaczonych odstępach czasowych, Doktorantka stwierdziła, że u szczurów cukrzycowych zastosowane w materiałach opatrunkowych związki: opioid-neurokinina (AWL3106) i opioidowy (Bifalina), w istotny sposób wpływały pozytywnie na skrócenie stanu zapalnego, przyspieszenie zarastania rany, ponowne naskórkowanie i zwiększyły wytrzymałość blizny w porównaniu do grupy szczurów kontrolnych, u których zastosowano do leczenia rany maść Iruxol®mono.

Oceniając całość dysertacji doktorskiej, warto podkreślić opracowanie przez Doktorantkę modelu naśladującego owrzodzenie u pacjentów z cukrzycą. Wybrała do swoich badań szczury rasy Wistar płci męskiej biorąc pod uwagę szansę na wyindukowanie cukrzycy streptozotocyną, wolniejszy od samic poziom gojenia ran i sposób wywołania oparzenia skóry. Wybór STZ do wywołania cukrzycy został oparty na piśmiennictwie. Według danych literaturowych po podaniu STZ zwierzętom obserwuje się stabilne objawy tej choroby – hiperglikemię, poliurię, mniejszą objętość insuliny i peptydu C, zaburzenia metabolizmu oraz innych typowych parametrów oraz objawów obserwowanych w długoterminowej cukrzycy (zmiany w pracy serca, zaćma, zmiany skórne). Ustalony przez Doktorantkę cukrzycowy model szczurzy jest podobny do ludzkiego, powtarzalny i stosunkowo tani. Dodatkowym atutem pracy jest wykorzystanie w tworzonych opatrunkach związków o budowie peptydów hybrydowych: Bifaliny, będącej dimeryczną pochodną enkefaliny oraz związku AWL3106, będącego pochodną dermorfiny i substancji P – neuropeptydu tachykininowego (11-aa). Kolejnym elementem podnoszącym wartość pracy jest zastosowanie białka keratynowego, jako nośnika wymienionych związków. Wykorzystanie keratyny – białka nieodegradowalnego przez enzymy proteolityczne zwierząt i ludzi, nie toksycznego i w zasadzie obojętnego dla organizmu, jest dobrym posunięciem – nie skutkuje reakcjami immunologicznymi. Jednocześnie warto zaznaczyć, że na keratynie, dzięki aminokwasowym motywom wiążącym



takim jak RGD, LDV, EDS można immobilizować różne peptydy lub białka, czy to chemicznie, czy fizycznie, co wykorzystała Doktorantka wiążąc peptydy hybrydowe z podłożem keratynowym. Warto także podkreślić, że wymienione wyżej substancje opioid-neurokinina (AWL3106) i opioidowy (Bifalina) zostały przez Doktorantę przetestowane pozytywnie w kierunku możliwości opracowania nowej terapii w leczeniu trudno gojących się ran. Opracowany w ramach pracy doktorskiej szczurzy model cukrzycowy naśladujący chorobę atakującą ludzi i doprowadzającą do powstawania stopy cukrzycowej pozwolił na zbliżenie się do rzeczywistych objawów występujących u pacjentów cukrzycowych, a w szczególności do cech powstających ran przewlekłych, które pozwoliły na testy terapeutyczne w kierunku ich gojenia. Warto tu podkreślić wybranie przez Doktorantkę długotrwałego działania hiperglikemii na badane szczury (70 dni, od podania STZ do wyindukowania rany), co imitowało zmiany metaboliczne w organizmie utrudniające gojenie rany cukrzycowej. Zastosowane w maściach substancje peptydowe okazały się być czynnikami przyspieszającymi zarastanie rany, w porównaniu do modelu kontrolnego. Osiągnięte rezultaty wykazały więc, że wyznaczony cel pracy został przez Doktorantkę osiągnięty.

Podczas zapoznawania się z treścią dysertacji nasunęły mi się **uwagi**. Nie wszystkie opisy metodyczne i wynikowe są jednoznaczne i dokładne, co wymaga ze strony Czytelnika poszukiwań danych w piśmiennictwie lub w dalszych częściach dysertacji. Poniżej zamieszczam swoje uwagi:

- Wg mojej oceny w Części Eksperymentalnej dysertacji należało zamieścić dane dotyczące źródła peptydów zastosowanych w eksperymentalnych opatrunkach. Czy w Laboratorium Syntez Chemicznych Centrum Badań Przedklinicznych i Technologii oprócz otrzymania keratyny z wełny alpaki, została także przeprowadzona synteza substancji AWL3106 i bifaliny? Kto te substancje przygotował – należało to podać.

- Zauważalny jest brak cytowań piśmiennictwa w pkt 1.4 dotyczącym preparatów leczniczych z udziałem keratyny, mimo podania w tekście, że produkty lecznicze oparte na keratynie są już dostępne (str. 44).

- Na str. 53 dysertacji zamieszczone są etapy zaplanowanych badań. W pkt 1 dotyczącym przeprowadzenia eksperymentu badawczego nie zamieszczono etapu dotyczącego zastosowania w grupie badanej opatrunków na wyindukowane rany, od razu wymieniono działanie – obserwacja gojenia rany i pobieranie materiału do badań.



- Doktorantka czasami używa niefortunnych zwrotów np. – „nowsze innowacje” (pkt 1.4), a przecież innowacja sama w sobie jest nowością; „zwierzęta uśmiercano” (pkt 3.5) – lepiej używać zwrotu zwierzęta poddano eutanazji; – „Mikroglej odpowiada za niszczenie mikroorganizmów takich jak wirusy” (str. 49) – wirusy są klasyfikowane poza grupą organizmów żywych, więc nie powinno się używać sformułowania „mikroorganizmy”; – „Keratyna jest biodegradowalna, a jej zachowanie w tkance zależy od pH keratyny” (str. 50-51) – tu należy wyjaśnić, że biodegradację definiuje się jako proces chemiczny, w którym wszczepione biomateriały ulegają hydrolitycznemu lub enzymatycznemu rozkładowi w układzie biologicznym. W przypadku keratyny to wiadomo, że jest podatna na rozkład proteolityczny przez enzymy należące do serynowych proteaz: proteinaza K, keratynaza. Jednak keratynaza nie ulega ekspresji u ludzi, co skutkuje wyższą stabilnością *in vivo* niż inne białka, takie jak kolagen, które są łatwo rozkładane przez wysoce selektywne enzymy np. kolagenazy. Dlatego nie powinno się mówić o biodegradacji keratyny. Natomiast materiały pochodzące z keratyn mogą być tworzone chemicznie z przestrajalną degradacją np. przez wykorzystanie poziomów usieciowania dwusiarczków.

- Umieszczone w dysertacji zdjęcia mikroskopowe preparatów histologicznych są małych wymiarów i przez to są trudne do oceny przez czytelnika

- Doktorantka często używa skrótów takich jak: ... w N-DM w porównaniu do DM; ich liczba w CO ... w porównaniu do DM ...; rany w CO zarastały się podobnie do DM ...; w 3106 w 7 i 14 dniu gojenia zarastały one ... w porównaniu do DM; w przekroju poprzecznym obserwowano w 3106 bardziej owalne/okrągłe naczynia krwionośne w porównaniu z DM; W 4 dniu w BIF powierzchnia nieznacznie zwiększyła się o; Badanie to w BIF pokazało; rany z ALP itp. – Podobnych skrótów myślowych w całej pracy jest bardzo dużo. Według mnie powinno się unikać takich sformułowań w dysertacji.

- W części dysertacji pkt 6 Podsumowanie i wnioski Doktorantka podsumowała, uzyskane w trakcie pracy, swoje wyniki eksperymentalne, bez wniosków. Można je odnaleźć w Streszczeniu pracy na str10-11.

W ocenie ogólnej pracy niewątpliwie można podkreślić, że praca jest koncepcyjnie interesująca i wykonawczo dobra. Uzyskane rezultaty mają wartości aplikacyjne, zwłaszcza w zakresie wykorzystywania substancji peptydowych, będących pochodnymi opioidowymi,



jako składniki maści na trudno gojące się rany, zwłaszcza w przypadku stopy cukrzycowej. Doktorantka wykazała, że oba związki hybrydowe skracają czas trwania zapalenia i wspomagają proces gojenia rany. Warto w tym miejscu podkreślić, że wymienione substancje były adsorbowane na keratynie z wełny alpak, białka biologicznie bezpiecznego, już wcześniej badanego przez zespół naukowy Zakładu Neuropeptydów pod kierunkiem śp. Prof. A. Lipkowskiego. A więc badania w ramach pracy doktorskiej są kontynuacją wcześniejszych eksperymentów.

Zaproponowany przez Doktorantkę dobór substancji aktywnych jako składników maści, pozwolił na otrzymanie dwu typów opatrunków (maści) o korzystnych właściwościach dotyczących regeneracji trudno gojących się ran. Aby spełnić wymagania, co do zastosowania nowego typu opatrunków w zabiegach terapeutycznych dotyczących gojenia ran przewlekłych, warto byłoby w przyszłości przeprowadzić szereg badań biologicznych *in vitro* oraz *in vivo* zgodnie z normami ISO, co być może potwierdziłoby wartość aplikacyjną maści opartych na hybrydowych peptydach oddziałujących na receptory opioidowe.

Wymienione przeze mnie w recenzji uwagi dotyczące niefortunnych sformułowań i błędów stylistycznych, które wkradły się do manuskryptu, są bez znaczenia dla merytorycznej wartości rozprawy. Są raczej z grupy edytorskich i nie zmieniają mojej dobrej opinii o pracy doktorskiej mgr A. Muchowskiej. Autorka z pewnością wykorzysta moje uwagi przy pisaniu innych prac.

Podsumowując: stwierdzam, że Pani mgr Adriana Muchowska posiada doświadczenie i umiejętności prowadzenia eksperymentów naukowych na dobrym poziomie. Praca wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący poszukiwania sposobu leczenia ran przewlekłych, szczególnie powstających przy zaawansowanej cukrzycy i zawiera istotne elementy nowości naukowej. Przedstawiona do oceny praca doktorska (biorąc pod uwagę wartości poznawcze i praktyczne pracy) wykazuje, że mgr Adriana Muchowska zrealizowała cel badawczy dotyczący opracowania nowych formułacji opatrunkowych o potencjale medycznym. Ponadto należy wymienić wkład publikacyjny z zakresu tematyki doktoratu mgr. A. Muchowskiej. Jest Ona współautorką 1 publikacji w czasopiśmie *Wound Repair and Regeneration* o punktacji ministerialnej 100 pkt i współczynniku IF=3,617, wydanej w 2020 r, w której jest pierwszym autorem. Dodać też należy, że badania naukowe dotyczące pracy doktorskiej A. Muchowskiej były finansowane z projektu MMRC-KNOW 2013-2017.



Uniwersytet Medyczny
w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Biochemii i Biotechnologii
ul. Chodźki 1 20-093 Lublin

prof. dr hab. Grażyna Ginalska

g.ginalska@umlub.pl

tel. 81 448 70 22

Po analizie całej dokumentacji z przekonaniem stwierdzam, że **Rozprawa doktorska Pani mgr biol. Adriany Muchowskiej spełnia, według mojej opinii, wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 r (dz. U. Nr. 65, poz. 595 z 16 kwietnia 2003 r z późniejszymi zmianami) „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN o dopuszczenie Doktorantki Adriany Muchowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**