

Dr hab. Wojciech Fabianowski

Warszawa, 8 V 2018

Wydział Chemiczny

Politechnika Warszawska

Noakowskiego 3; 00 664 Warszawa

Tel. (022) 234 7670; kom. 0603980373

e-mail wofab@ch.pw.edu.pl

Opinia o rozprawie doktorskiej mgr Anny Grzeczkowicz

pt. "Immobilizacja materiału biologicznie aktywnego z wykorzystaniem nano-cienkiej membrany dla celów terapeutycznych"

Praca pt. "Immobilizacja materiału biologicznie aktywnego z wykorzystaniem nano-cienkiej membrany dla celów terapeutycznych" została przedłożona przez mgr Annę Grzeczkowicz Radzie Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk jako rozprawa doktorska. Promotorem pracy jest dr hab. inż. Ludomira Granicka, prof. nadzw. w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej.

Praca przedstawiona jest w formie rozbudowanego, prawie 30-stronicowego wprowadzenia zawierającego omówienie wykonanych prac, dyskusję otrzymanych wniosków oraz 5 artykułów powiązanych tematycznie z zagadnieniem wykorzystania do celów terapeutycznych, głównie do systemów stomatologicznych nanocząstek srebra lub złota lub cienkich membran otrzymanych z monowarstw polielektrolitowych, wzorowanych na pionierskich pracach Dechera i Schmitta. Mgr Anna Grzeczkowicz jest współautorką wszystkich omawianych artykułów i jest wymieniana w nich albo jako pierwszy autor albo drugi autor. Ostatni, piąty artykuł jest dopiero przygotowywany do druku ale może być traktowany jak rozdział tak jak to jest w najczęściej pisanych rozprawach doktorskich. Cztery pierwsze artykuły były publikowane w czasopiśmie *peer-reviewed* a zatem zostały już poddane ocenie i ewentualnej korekcie niemniej ponieważ zostały umieszczone w rozprawie doktorskiej zostaną również omówione pod kątem przydatności merytorycznej do omawianej pracy doktorskiej. Z obowiązku recenzenta muszę jednak wykazać pewne braki czy inne literówki, na jakie natrafiłem w pracy pani mgr Anny Grzeczkowicz. Na stronie 4 (z literówką) oraz na stronie 9 pojawia się termin a dokładniej neologizm „nanoopłaszczanie”. Jakoś wydaje mi się być niepasujący, może terminy opisowe (zamykanie komórek, otaczanie

warstwą polielektrolitową) byłby mniej dziwny. Wymieniona na str 13 polietylenimina PEI została zaliczona do polimerów o ładunku ujemnym. Rzeczywiście, w roztworach niewodnych, zgodnie z teorią Lewisa może być zaliczona do polimerów elektrodonorowych, o charakterze zasadowym. Ale w roztworach wodnych grupy aminowe protonowane tworzą polimer o charakterze polikationu. Podobnie wzór poli-L-lizyny PLL na stronie 14 jest niepoprawny, grupa aminowa jest w łańcuchu bocznym a nie w łańcuchu głównym. Do drobnych błędów można zaliczyć literówkę na str 26 (Referencja 17).

Pierwszy artykuł „*The experimental study of the performace of nano-thin polyelectrolyte shell for dental pulp stem cells immobilization*” autorstwa mgr Anny Grzechkiewicz, L. Granickiej, I. Maciejewskiej, M. Strawskiego, M. Szklarczyka i M. Borkowskiej został opublikowany w *J. Nanosci. Nanotechn.* 15, 9531 – 9538 w 2015 roku. To liczące się w świecie naukowym czasopismo przyjmuje tylko najlepsze opracowania z dziedziny tak ważnej jaką jest medycyna i ochrona zdrowia ludzkiego realizowane z powołaniem się na może w ostatnich latach nadmiernie eksploatowane ale wciąż znaczące słowo „nano”. Na liście ministerialnej (<http://www.nauka.gov.pl/ujednolicony-wykaz-czasopism-naukowych/>), czasopismo to znajduje się wysoko - "Journal od nanoscience and nanotechnology" - lista A, pozycja 8223, strona 258/348, 20 punktów za publikację artykułu. To duże wyróżnienie dla mgr Annę Grzechkiewicz, że współautorzy zdecydowali się na umieszczenie właśnie jej nazwiska jako pierwszego autora. Jest też to bezpośredni dowód na wkład mgr Annę Grzechkiewicz w powstanie tego opracowania. Rozprawa doktorska mgr Anny Grzechkiewicz dobrze wpisuje się w podstawowy kierunek badań w dziedzinie inżynierii materiałowej – badań nad rozwiązaniami nanotechnologicznymi. Zaproponowano dwie standardowe metody unieruchomienia komórek poprzez enkapsulację lub na powierzchni rusztowań – skafoldów otrzymanych z multiwarstw z naturalnych polielektrolitów. Dyskutując rodzaje wiązań możliwych do wykorzystania w budowie oddziaływań podkład – komórka (str 9) słusznie rozdzielono na wiązania I rzędu, kowalencyjne i wymieniono wiązania estrowe, peptydowe ale pominięto wiązania siarczkowe, tak istotne dla tworzenia struktury III – rzędowej białek. Z kolei omawiając procesy adsorpcji z wykorzystaniem sił II – rzędu wymieniono oddziaływania jonowe, siły van der Waalsa ale pominięto wiązania wodorowe, tak istotne ze względu na swój anizotropowy charakter. Szczególny nacisk położony został na zabezpieczanie komórek przez enkapsulację i opłaszczanie metodą *layer – by – layer* z wykorzystaniem warstw polielektrolitowych, zaproponowanych w latach 90-tych ubiegłego stulecia przez G. Dechera i Johanna Schmitta. Metoda ta łączy prostotę otrzymywania, łatwość konstrukcji struktur

nawet multiwarstwowych, możliwość wbudowania (podobnie jak rodzyńki w cieście) cząsteczek funkcjonalnych oraz przede wszystkim biogodność, wynikająca głównie z stosowania jonowych pochodnych polimerów naturalnych (polisacharydów) oraz podobieństwo do budowy naturalnych błon komórkowych typu BLM. Można zgodnie z Autorką rozprawy doktorskiej sądzić, że jest to w przypadku inżynierii materiałowej biomateriałów bardzo obiecujący kierunek badań. Na podkreślenie zasługuje dobrze sformułowany cel i tezy zrealizowanej pracy (str 21). Z jednej strony wykonano badania multiwarstw polielektrolitowych zbudowanych w różnych wariantach otaczających komórki macierzyste miazgi zębów. Dobór tych właśnie komórek może nie być kluczowy dla wyzwań stojących przed współczesną medycyną ale warto pamiętać, że jest to bolesny i dotyczy większości dzieci i wszystkich dorosłych problem, związany z próchnicą zębów, której leczenie polega na głównie na zapobieganiu a potem już tylko usuwanie i wypełnianie ubytków. Możliwość regeneracji miazgi zębowej jest bardzo atrakcyjna i każdy, kto chodził do dentysty doceni wagę tego zagadnienia. Drugi temat tezy pracy ma jeszcze większe znaczenie związane z wciąż nierozwiązanym problemem odbudowy struktury neuronowej i przywrócenia przewodzeniem sygnałów nerwowych w organizmach żywych. Prace badawcze dające pewien postęp i co za tym idzie nadzieję, na ponowne przywrócenie czynności nerwowych w bezwładnych kończynach o upośledzonych tkankach mają olbrzymie znaczenie. Doświadczenia z podtrzymywaniem funkcji życiowych komórek nerwowych szczurzych za pomocą membran polielektrolitowych z polimerów naturalnych (pochodne polisacharydowe) lub syntetycznych, umożliwienie wzrostu komórek nerwowych w badaniach *in vitro* ma trudne do przecenienia znaczenie i dobrze, że właśnie ten temat podjęła pani mgr Anna Grzeczko w swojej rozprawie doktorskiej.

Tutaj muszę dodać taką moją osobistą uwagę, że w badaniach komórkowych potrzebne są u wykonującego szczególne predyspozycje. Musi być cierpliwy, dokładny, uporządkowany w pracy laboratoryjnej, gotów do wykonywania wielokrotnych powtórzeń tych samych doświadczeń. Takie cechy moim zdaniem rzadko spotykane są wśród doktorantów i każdy, kto podejmuje się wykonywania takich zadań zasługuje na szacunek i uznanie. Druga uwaga dotyczy aspektu praktycznego wykonywanych prac. Warto podkreślić, że nie były to same tylko badania teoretyczne, też ważne i o kluczowym znaczeniu, ale posiadały też od razu wyraźnie zarysowany aspekt praktyczny. Przykładowo sprawdzono żywotność komórek miazgi zębowej w obecności kilku handlowych preparatów dentystycznych (str 20 – 21). Taki związek badań podstawowych z działalnością praktyczną również zasługuje na podkreślenie.

Do artykułu pierwszego „*The experimental study of the performance of nano-thin polyelectrolyte shell for dental pulp stem cells immobilization*” autorstwa mgr Anny Grzeczkowicz, L. Granickiej, I. Maciejewskiej, M. Strawskiego, M. Szklarczyka i M. Borkowskiej został opublikowany w *J. Nanosci. Nanotechn.* 15, 9531 – 9538 w 2015 roku trudno mieć jakieś zastrzeżenia. Porządna praca, już sama w sobie, zważywszy wyjątkowo duży materiał doświadczalny i przekonujący sposób przedstawienia wyników, może być podstawą ubiegania się o stopień doktora.

W artykule drugim „*Cytotoksyczność materiału Nanocare Gold w badaniach in vitro – badanie pilotażowe*” autorstwa A. Mackiewicz, A. Grzeczkowicz, L. Granicka, M. Antosiak – Iwańska, E. Godlewska, D. Gozdowski, D. Olczak – Kowalczyk opublikowanego w *Dent. Med. Probl.* 2015, 52, 2, 167 – 174 ("Dental and Medical Problems" - lista B (<http://www.nauka.gov.pl/ujednolicony-wykaz-czasopism-naukowych/>), pozycja 408, strona 12/64, 11 punktów za publikację artykułu) przedstawiono ciekawe badania nad handlowym preparatem koloidalnego złota i srebra w kompozycji z trzema układami produkcji włoskiej, japońskiej i z USA stosowanymi w dentystyce do uzupełniania ubytków. Zbadano oddziaływanie a dokładniej cytotoksyczność samego preparatu Nanocare Gold oraz w mieszaninach z handlowymi wypełniającymi materiałami w kontakcie z komórkami Jurkat będącymi linią ostrej białaczki limfoblastycznej T. Komórki Jurkat wykorzystano z względu na ich odporność na różne czynniki chemiczne. W artykule przede wszystkim wyróżnia się rzetelność prowadzonych badań, kontrola statystyczna przedstawionych wyników oraz połączenie z mocno zarysowanym aspektem praktycznym: próchnica jest chorobą dotykającą prawie całą populację dzieci w Polsce i zbadano preparaty handlowe a nie substancje wzorcowe. Takie podejście, ważne dla przede wszystkim lekarzy stomatologów niesie pewne niebezpieczeństwo, że nie do końca można właściwie zinterpretować wyniki, nie znając dokładnie składu badanych substancji. Można wyciągnąć wnioski, że układ Nanocare Gold z OptiBond Solo Plus jest wątpliwy i wymaga dodatkowych badań, bo nie jest jasne, dlaczego tak się dzieje. Już sam materiał wyjściowy Nanocare Gold nie jest dokładnie zdefiniowany, nie ma jego zdjęć SEM ani analizy składu na przykład metodą EDX ale sądzę, że wynika to z poszanowania dla tajemnic handlowych producentów. Ważny artykuł zwłaszcza dla lekarzy stomatologów a w konsekwencji i dla nas wszystkich, ich pacjentów.

W artykule trzecim, „*An initial evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a disinfection liquid with silver nanoparticles combined with a glass – ionomer cement and dentin bonding systems*” przyjętym do druku w *Advances in Clinical and Experimental Medicine* autorstwa A. Porenczuk, A. Grzeczkowicz, I. Maciejewska, M. Gołaś,

K. Piskorska, A. Kolenda, D. Gozdowski, L. Granicka, E. Kopeć – Swoboda, D. Olczak – Kowalczyk ("Advances in Clinical and Experimental Medicine" - lista A, pozycja 282, strona 9/348, 15 punktów za publikację artykułu) zbadany został podobny układ jak to było przedstawione w poprzednim artykule ale w znacznie szerszy sposób oraz badania przeprowadzono na komórkach z pulpy zębnej, a zatem na materiale już bezpośrednio związanego z zagadnieniami dentystycznymi. Również w tym artykule na podkreślenie zasługuje rozbudowana część doświadczalna, z co najmniej potrójnie wykonanymi powtórzeniami eksperymentów, dokładna sprawozdawczość w opisie stosowanych materiałów i otrzymanych wyników.

W artykule czwartym „*Detection of nano-thin polyelectrolyte shells on biological material*” autorstwa L. Granicka, A. Grzeczkwicz, M. Borkowska, I. Lipka opublikowanym w *Membranes and Membrane Processes in Enviromental Protection, Monographs of the Enviromental Committee Polish Academy of Sciences*, vol. 118, 355 – 366, 2014 dotyczy istotnego zagadnienia o znaczeniu podstawowym – dużo dyskutuje się o enkapsulacji komórek, o ich opłaszczaniu nanocienkimi powłokami a jaki jest bezpośredni dowód, że komórki rzeczywiście mają zmieniony skład i budowę warstwy zewnętrznej ? Jest to ważne zagadnienie, przez porównanie z żywymi komórkami, rolę kwasu sjałowego w zewnętrznej powłoce błony komórkowej i wytworzenie w ten sposób polielektrolitowej warstwy o charakterze anionowym, czyli ładunku ujemnym zapobiegającym koagulacji i łączeniu się komórek ze sobą. Warto w tym miejscu przypomnieć o licznych pracach badawczych jakie wykonano nad materiałami polimerowymi kontaktującymi się z krwią, w celu zapewnienia ich powierzchni atrombogenności poprzez nadanie trwałego ładunku ujemnego (na przykład folie elektretowe) lub polianionowego (heparynizacja). Dobrze, że taka praca o charakterze podstawowym, w której zbadano około 10 różnych kombinacji polielektrolitowych zbudowanych z polimerów naturalnych (alginiany) jak i syntetycznych – typu poli(styreno sulfonian). Dodatkową trudnością w przeprowadzonych badaniach, co również zasługuje na podkreślenie, zbadane zostały układy polielektrolitowe na żywych komórkach a nie jak to ma miejsce w większości prac badawczych z zakresu otrzymywania struktur multiwarstwowych – badane są na płaskich podłożach, typu płytka krzemowa, mika czy szkło mikroskopowe często z napyłoną warstwą przewodzącego metalu – złota co umożliwia wykonanie doświadczeń (pomiar grubości metodą elipsometryczną, pomiary elektrochemiczne metodą cylicznej woltametrii CV, pomiary składu elementarnego metodą XPS i GA XPS, pomiary FTIR metodą RAS). Szkoda, że w tak ważnej pracy o charakterze podstawowym, często unikany przez badawczy właśnie z powodów trudności eksperymentatorskich znalazło się

parę drobnych błędów, które w łatwy sposób mogły być poprawione. Wymieniając stosowane polimery opisywana jest na przykład polietylenoimina (poprawnie, str 357) ale już niepotrzebnie z nawiasem jest wymieniana na str 356 jako poly(ethyleneimine). Za to poli(styrene sulfonate) wymieniony poprawnie (z nawiasem) na str 356 za to na str 357 powtórzony jest błędnie, bez nawiasu. Szkoda, że nie dano poglądowego rysunku przedstawiającego badane układy multiwarstwowe, to by znacznie bardziej ułatwiło czytelnikowi w nadążaniu za tokiem rozumowania PT Autorów niż śledzenie stosowanych skrótów literowych. Na wykresach 6; 7; 8 można było dodać punkt odniesienia wartość kąta zwilżania dla membran niemodyfikowanych a nie tylko podanie (str 362) wartości liczbowej bliskiej 90^0 . Podobnie jak to było w poprzednich opracowaniach, praca a zwłaszcza materiał doświadczalny, co trzeba jeszcze raz podkreślić – trudny do wykonania materiał doświadczalny został dokładnie opisany, wykonano sześciokrotne (str 359) powtórzenia eksperymentów, to wszystko zasługuje na uznanie i szacunek dla wykonanej pracy.

Artykuł piąty „*Polyelectrolyte membranę scaffold for neuronal cells growth sustaining*” autorstwa A. Grzeczkwicz, J. Gruszczyńska-Biegała, M. Czeredys, A. Kwiatkowska, M. Strawski, M. Szklarczyk, M. Koźbiał, J. Kuźnicki, L. H. Granicka jest w pewnym sensie kontynuacją i rozwinięciem poprzedniego artykułu. To dobrze bo taka praca podstawowa powinna być powtórzona i wykonana co najmniej kilka razy. W zasadzie ten artykuł ten może być traktowany jako kolejny rozdział w klasycznym układzie rozprawy doktorskiej, gdyż jest dopiero w postaci opracowanego manuskryptu jeszcze nie przyjętego do druku, przed opiniami recenzentów. Dlatego może być poddany bardziej szczegółowej analizie i wnioskowaniem o dokonanie ewentualnych zmian. Począwszy od sugerowanej zmiany tytułu z „*Polyelectrolyte membranę scaffold for neuronal cells growth sustaining*” na bardziej zwarty i skoncentrowany na wzroście komórek neuralnych np „*Polyelectrolyte membranę scaffold for neuronal cells growth*”. Cel pracy jest dobrze sformułowany, dotyczy szalenie istotnego i wciąż nierozwiązanego zagadnienia zapewnienia ciągłości układu komórek neuronowych, zwłaszcza wywołania ich wzrostu w wybranym kierunku. Ważnym osiągnięciem pracy są pomiary sił adhezji uzyskane z pomiarów za pomocą AFM wykonanych w warunkach *in situ* w warstwach polielektrolitowych spęcznionych w 0.15 M NaCl. Praca wymaga jednak pewnej korekty formalnej, za dużo jest w niej drobnych pomyłek. I tak na str 1 winno być...using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Zeta potential, Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The suspension of rat cortical neuronal cells were seeded.... I ponownie na tej samej str 1 winno być ...promoted neurons growth similarly as....Na str 3 w rozdziale Materials trzeba

poprawić spacje – przykładowo ...15 – 30 kDa...; spacje przed przecinkami. Na str 1 wymieniono ..control scaffold (poly-D-lysine/laminin)... i opisano je też na str 14 ...and for PDL/Laminin... ale w Materials (str 1) nie wymieniono źródła ich pochodzenia. Wymieniając szereg badanych układów określonych różnymi skrótami na str 3 w Methods warto byłoby moim zdaniem dodać poglądowy rysunek z zaznaczonymi ładunkami „+” i „-”, badanych układów polielektrolitowych. Podając adres Komisji d/s Etyki warto uzupełnić adres o ...Warsaw, Poland. Na str 4 w rozdziale FTIR measurements dwa razy należy wpisać ...for infra red irradiation... a z kolei na str 5 wprowadzone słusznie poprawki w postaci przekreśleń powinny być usunięte (w rozdziale Immunocytochemistry/immunostaining). Dlaczego na str 5 w rozdziale Statistical analysis termin gene expresion napisano kursywą – nie jest dla mnie jasne. Ładne zdjęcia z AFM na str 6 warto by uzupełnić zdjęciem czystego podkładu miki i dla wszystkich zdjęć zaznaczyć linię przekroju i narysować dla niej profilogram. Ciekawe a nawet pionierskie są wyniki z rozdziału „Evaluation of the membranes” str 8 opisujące pracę adhezji pomiędzy różnymi warstwami polielektrolitowymi. Nie są liczne prace dotyczące wpływu właściwości mechanicznych podłoża (ich twardość, istniejące w nich naprężenia) na wzrost i różnicowanie się komórek, nie tylko neuronowych ale też i innego rodzaju (chondrocytów, keratynocytów). To są wciąż pionierskie prace bo właściwości mechaniczne podłoża są rozpoznawane przez rosnące na nich komórki i wciąż brakuje prac o charakterze bardziej podstawowym opisujących te zależności. Dlatego też warto moim zdaniem przedstawić na diagramie z zaznaczonymi odchyleniami standardowymi i liniami określającymi pracę adhezji jako niską (10×10^{-17} J); umiarkowaną (pomiędzy 10×10^{-17} J i 100×10^{-17} J) oraz wysoką ($>100 \times 10^{-17}$ J). Podobnie ważne wnioski przedstawiono na str 12 po obserwacjach w mikroskopie fluorescencyjnym wiążące kształt obrazu komórek nerwowych po 2 tygodniach inkubacji. Czy udałoby się powiązać te obrazy z opisaną powyżej pracą adhezji pomiędzy warstwami i ich profilogramami ? Na str 8 należy też poprawić ...fullerenol... Na str 14 i 15 należy uzupełnić odchylenia standardowe a na str 15 usunąć korektę (przekreślenia). Obserwowany około 5-krotnie mniejszy wzrost komórek nerwowych niż w układzie odniesienia PDL/LAM (wykresy str 17, dyskusja str 18) powinien być dokładniej zanalizowany. Czy to jest czynnik dyskredytujący badane układy polielektrolitowe ? Czy brak pozytywnego (większego)w wzroście komórek nerwowych wobec hydroksylowanych fullerenoli, co jest w sprzeczności z cytowaną pracą [29] jest wynikiem jakiegoś błędu czy może innych warunków eksperymentu ? Warto moim zdaniem wzbogacić dyskusję o takie rozważania, zwłaszcza, że PT Autorzy dysponują bardzo dużym

materiałem doświadczalnym a i już publikowane przez nich prace dobrze świadczą o ich warsztacie badawczym. Warto by też spróbować połączyć obserwowane zalety układu polielektrolitowego ALG/PLL z ich właściwościami mechanicznymi, obserwacjami z mikroskopu fluorescencyjnego oraz możliwych innych oddziaływań z komórkami, za pomocą na przykład wiązań wodorowych.

Należy jednak stwierdzić, że są to wszystko drobne błędy, albo szczerze mówiąc znikome pomyłki, które każdemu mogą się zdarzyć. Sam też w recenzji posługuję się często anglicyzmami i wiem, jak trudno tego uniknąć.

Należy podkreślić, że wymienione niedostatki w żaden sposób nie pomniejszają wartości pracy ani nie zmieniają wcześniej przedstawionych ocen jego dorobku. Mgr Anna Grzeczkowicz wykonała bardzo dużą pracę doświadczalną, sukcesem są zwłaszcza prace dotyczące oddziaływań warstwy polielektrolitowej – żywe komórki, w sposób zwięzły i logiczny wszystko opracowała i opublikowała. Pani mgr Anna Grzeczkowicz wykazała się dużymi zdolnościami eksperymentatorskimi, dużą sprawnością i przenikliwością w interpretacji wyników, zdolnościami eleganckiego i przekonującego sposobu przekazywania otrzymanych rezultatów. Pani mgr Anna Grzeczkowicz jest dobrze przygotowana do prowadzenia samodzielnych badań i rozwiązywania ambitnych zadań. Dlatego jestem przekonany, że rozprawa ta spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom tego rodzaju i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Anny Grzeczkowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


(Wojciech Fabianowski)