

Recenzja

**pracy doktorskiej Pani mgr inż. Angeliki Kwiatkowskiej
pt. " Nanomodyfikacja membran i nanoenkapsulacja materiału biologicznie
aktywnego dla celów medycznych", wykonanej pod naukowym
kierownictwem Pani dr hab. inż. Ludomiry Granickiej**

1. Jedną z tendencji charakterystycznych dla współczesnej medycyny jest działanie lecznicze bezpośrednio w miejscu wymagającym terapii. Jest to szczególnie istotne w przypadkach stosowania silnych środków farmakologicznych, dla których różnica pomiędzy minimalnym stężeniem toksycznym a minimalnym stężeniem terapeutycznym jest niewielka. Idea wszelkiego rodzaju wszczepów, z których uwalniany jest lek, umieszczanych jak najbliżej leczonego miejsca jest w swej zasadzie nad wyraz prosta i od wielu lat znana. Realizacja tego typu terapii jest jednak bez porównania trudniejsza od tradycyjnych metod podawania leku. Implikuje ona dwa podstawowe problemy:

- wymagana jest odpowiednia biogodność pomiędzy organizmem biorcy a materiałami zastosowanymi we wszczepie
- należy zapewnić odpowiednią szybkość uwalniania się danego specyfiku przez czas wymagany okresem terapii.

Oba te zagadnienia wchodzą w zakres inżynierii biomedycznej. Są to zagadnienia bardzo skomplikowane, jako że rozpatrywany proces zachodzi w warunkach nieustalonych zarówno odnośnie stężenia stosowanego leku jak i oddziaływania organizmu biorcy na właściwości transportowe stosowanego materiału wszczepu.

Można przyjąć, że praktycznie cały międzyfazowy transport masy w organizmie człowieka odbywa się przez różnego typu membrany półprzepuszczalne. Stąd oczywistym jest działanie na rzecz wykorzystania przez inżynierię biomedyczną membran syntetycznych o zaprogramowanych właściwościach.

Powszechnie przyjmuje się, że wiedza o transporcie przez klasyczne membrany oraz technologia ich wytwarzania ma dziś ugruntowane podstawy. Jednakże ostatnie lata otworzyły w tym obszarze, zwłaszcza przed inżynierią biomedyczną, nowe możliwości wynikające z osiągnięć inżynierii materiałowej. Dotyczy to szeroko rozumianej nanotechnologii. Unikalne, często zaskakujące właściwości nanocząstek czy też struktur dwuwymiarowych o rozmiarach odpowiadających zakresowi nanometrów są ciekawym materiałem badawczym o obiecującym potencjale aplikacyjnym.

Mając powyższe na względzie tematykę recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam za bardzo aktualną, wartą intensywnych badań.

2. Przedstawiona do recenzji rozprawa została opracowana wg oryginalnej opcji przewidzianej przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym. Składa się ona z czterech opublikowanych artykułów, których Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska jest współautorem, tj.:

1. **A. Kwiatkowska**, L. Granicka, A. Grzeczkwicz, A. Chwojnowski, C. Wojciechowski: Nanothin polyelectrolyte layers for biotechnological applications, Desalination and Water Treatment, 64 (2017) 260-265
2. **A. Kwiatkowska**, L. Granicka, A. Grzeczkwicz, R. Stachowiak, M. Kamiński, Z. Grubek, J. Bielecki, M. Strawski, M. Szklarczyk: Stabilized nanosystem of nanocarriers with an immobilized biological factor for anti-tumor therapy, PloS ONE, 12 (2017) e01709925
3. **A. Kwiatkowska**, L. Granicka, A. Grzeczkwicz, R. Stachowiak, P. Bącal, K. Sobczak, M. Darowski, M. Kozarski, J. Bielecki: Gold Nanoparticle-Modified Poly(vinyl chloride) Surface with Improved Antimicrobial Properties for Medical Devices, Journal of Biomedical Nanotechnology, 14 (2018) 922-932
4. M. Drabik, B. Kazimierczak, A. Grzeczkwicz, A. Antosiak-Iwańska, **A. Kwiatkowska**, L. Granicka: The membrane composite with silver nanoparticles for fibroblastic cell growth sustaining, Desalination and Water Treatment, 101 (2018) 70-76

oraz bardzo obszernego manuskryptu, który w części można uważać za rodzaj przewodnika po tych artykułach (rozdział pt. "Omówienie wyników i podsumowanie") oraz który przedstawia podstawowe informacje o zagadnieniach rozpatrywanych w tych artykułach (rozdział pt. "Wprowadzenie"). Lektura tego manuskryptu jednoznacznie wskazuje na dobre rozeznanie Doktorantki w tematyce objętej rozprawą doktorską.

Spełnione są wszystkie wymogi formalne stawiane w/w opcji rozprawy doktorskiej. We wszystkich przedstawionych artykułach wspólnie z Doktorantką współautorem jest Pani Promotor dr hab. inż. Ludomira Granicka. W trzech spośród tych artykułów Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska jest pierwszym autorem. Artykuły te zostały opublikowane w czasopismach o relatywnie wysokich wskaźnikach IF (w sumie 12,793). Liczba autorów poszczególnych artykułów jest stosunkowo duża. Wynika to jednak ze specyfiki prowadzonych badań, które wymagają wysoko wyspecjalizowanej współpracy. Na podstawie lektury całości zamieszczonej dokumentacji oraz oświadczeń współautorów nabrałem przekonania, że wkład Doktorantki w opracowanie tych artykułów jest istotny. Stanowi to uzasadnioną podstawę do uznania przedstawionej dokumentacji jako rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Angeliki Kwiatkowskiej.

3. W swej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska na podstawie trafnie przeprowadzonego przeglądu obszernie cytowanej literatury postawiła trzy podstawowe cele:

- uzyskanie stabilizowanego systemu dostarczania czynników aktywnych do komórek docelowych, zbudowanego z nanonośników pokrytych membraną o grubości z zakresu nanometrów,
- uzyskanie nano-cienkiej wielowarstwowej membrany wspomagającej w konfiguracji z suportem adhezję komórek,
- uzyskanie nano-modyfikowanej, bakteriostatycznej powierzchni jako prekursora do współpracy z komórkami eukariotycznymi.

Są to istotne i ambitne cele, precyzyjnie sformułowane, których osiągnięcie będzie z pewnością liczącym się krokiem w tematyce dotyczącej szeroko rozumianego stosowania wszczepów.

Należy podkreślić, że Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska w prowadzonych eksperymentach stosuje nowoczesne metody badawcze, umiejętnie i z właściwym doborem wykorzystuje wysokospecjalistyczną aparaturę. Bardzo pozytywnie należy

ocenić również współpracę z genetykami. Dzięki tej współpracy, w badaniach nad dostarczaniem terapeutyków do miejsc docelowych, udało się na drodze genetycznej modyfikacji mikroorganizmu *Escherichia coli* zaprojektować produkt (listeriolizyna O) indukujący apoptozę w komórkach nowotworowych. (Należy tu wyraźnie podkreślić, że wspomniana uprzednio stosunkowo duża liczba autorów artykułów stanowiących rozprawę doktorską jest całkowicie uzasadniona specyfiką prowadzonych prac badawczych). Uzyskana listeriolizyna O została przez Doktorantkę umieszczona w nano-cienkiej powłoce zbudowanej z poli(etylenoiminy) oraz z kwasu hialuronowego. Jako nośnik leku zostały utrwalone komórki bakteryjne o rozmiarach nano. Wybór tych substancji jest całkowicie uzasadniony. Ich przydatność do konstrukcji wszczepów została wcześniej potwierdzona przez wielu badaczy. Dodatkowo nanonośniki zostały sprzężone z utrwaloną komórką eukariotyczną. Rozwiązanie takie miało na celu zwiększenie strumienia masy leku dostarczanego do komórek nowotworowych a zainkorporowane na ich powierzchni receptory transferynowe zwiększały powinowactwo takiego układu do komórek nowotworowych.

Swoimi badaniami Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska wykazała, że zaproponowany przez Nią system dostarczania określonych substancji do komórek docelowych wykazuje zwiększone powinowactwo do komórek nowotworowych w porównaniu z nośnikami niemodyfikowanymi. Uzyskane w tym zakresie wyniki, choć dotyczą fragmentu zagadnień związanych z aplikacją wszczepów stanowią bez wątpienia liczące się osiągnięcie Doktorantki, poszerzają wiedzę w tym zakresie.

Do funkcjonalizacji powierzchni składnikami o rozmiarach nanometrów Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska wybrała cząstki złota, których właściwości antybakteryjne są znane i od lat stosowane. Obiektem badań były rurki krtaniowe wykonane z poli(chlorku winylu), używane do wspomagania procesu oddychania. W pierwszym kroku powierzchnia PCV była aktywowana tiolami, co prowadziło do uzyskania powierzchni polimeru zawierającej grupy siarkowe, mogące oddziaływać z nanocząstkami złota. Doktorantka opracowała dwie metody syntezy takiego połączenia. Badaniami za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazano istotną obecność na powierzchni polimeru nanocząstek złota o rozmiarze od 4 do 18 nm.

Właściwości antybakteryjne powierzchni z tak osadzonymi nanocząstkami złota weryfikowano na szczepach Gram-dodatnich (*E. coli*, *P. aeruginosa*) oraz Gram-ujemnych (*L. monocytogenes*, *B. subtilis*). Stwierdzono, że spreparowane w/w metodą powierzchnie PCV wykazują działanie bakteriostatyczne do wszystkich badanych

szczepów, przy czym nie uzyskano całkowitego zatrzymania proliferacji komórek bakteryjnych.

Ten fragment badań Pani mgr inż. Angeliki Kwiatkowskiej w dużym stopniu wykorzystywał wyniki dotychczasowych badań, prowadzonych przez wielu autorów, nad nanocząstkami złota osadzonymi na różnego rodzaju powierzchniach. Doktorantka uzyskała wyniki zbliżone do wyników innych autorów, co poszerza zbiór informacji o tej metodzie.

Interesującym zagadnieniem poruszonym w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest pokrywanie wybranych elementów materii nano-cienkimi membranami z polielektrolitów. Ze względu na wykazywaną aktywność chemiczną w powłokach takich można immobilizować różnego rodzaju czynniki aktywne, w tym także elementy o rozmiarach nanometrów. Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska podjęła się zadania przeprowadzenia kontrolowanego wzrostu komórek adherentnych. W tym celu opracowała suport poliuretanowy, na który nanosiła dwa układy warstw: polilizynowo-alginianową oraz polilizynowo-polietylenoiminową. Układy takie wytwarzano metodą „warstwa po warstwie”. Badanie biozgodności powłok przeprowadzono in vitro na linii komórkowej WEHI-164. Szczegółowo określono morfologię i powierzchnię opracowanego układu. Wykazano możliwość zastosowania zaproponowanego systemu w bioinżynierii i biotechnologii. Dotychczas zaprezentowane przez Doktorantkę wyniki pokazują obiecujące możliwości w tym zakresie.

Lektura rozprawy doktorskiej wskazuje, że Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska opracowała i dobrze opanowała techniki wytwarzania nano-cienkich membran z przeznaczeniem do zastosowań w inżynierii biomedycznej oraz ich agregowanie z cząsteczkami o rozmiarach nanometrów. Stanowi to bez wątpienia Jej osiągnięcie naukowe i wnosi nowe informacje do tej dziedziny nauki. Doktorantka bardzo sprawnie posługuje się nowoczesnymi technikami badawczymi a stawiane przez Nią wnioski są z reguły dobrze uzasadnione. Wyniki zaprezentowane przez Panią mgr inż. Angelikę Kwiatkowską w pełni spełniają oczekiwania i wymagania stawiane rozprawą doktorskim.

4. Artykuły, stanowiące rozprawę doktorską były poddane recenzjom w czołowych czasopismach z zakresu inżynierii biomedycznej i nauki o membranach. Stąd praktycznie wykluczone są nieścisłości czy błędy interpretacyjne przy omawianiu wyników. Komentarz (manuskrypt rozprawy doktorskiej) do tych artykułów napisany jest przejrzysto i spełnia swoją rolę. Nie oznacza to, że lektura tych prac nie nasuwa

pewnych uwag o charakterze dyskusyjnym. Z obowiązku recenzenta poniżej kilka z nich.

- a) Aktualny stan wiedzy w tematyce objętej rozprawą doktorską nie pozwala na uogólnienia. Z tej przyczyny, w opisie uzyskiwanych wyników, praktycznie nie występują funkcje matematyczne, większość podawanych informacji ma charakter jakościowy, co najwyżej ilościowy i dotyczy z reguły konkretnych układów. Niemniej byłoby wskazane przedstawić jakiś model jakościowy, którego analiza udokumentowałaby celowość podejmowanych badań i wskazywała na ewentualne oczekiwania.
- b) Bardzo lakonicznie przedstawiono zagadnienia związane z transportem membranowym. Jak rozumieć współczynnik dyfuzji dla membrany porowatej? Podana dokładność (miejsca znaczące) tej wartości jest wyraźnie przesadzona.
- c) Jak wyznaczano kinetykę nieustalonego transportu w badanych układach?
- d) W klasycznych wszczepach membranowych opór transportu masy przez membranę jest proporcjonalny do jej grubości i jest z reguły oporem dominującym. Jak się to ma w przypadku membran o grubości z zakresu nanometrów? Czy dalej jest to opór dominujący?

Powyższe uwagi stanowić mogą kanwę do dyskusji podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. W żadnym stopniu nie umniejszają mojej w pełni pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy.

Reasumując uważam, że Pani mgr inż. Angelika Kwiatkowska rozwiązała z powodzeniem zadania będące celem Jej rozprawy doktorskiej, która stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe. Wykazała się przy tym wiedzą oczekiwaną od kandydata do stopnia doktora w dyscyplinie naukowej inżynieria biomedyczna.

Uważam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane formalnie i zwyczajowo pracom doktorskim i stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Angeliki Kwiatkowskiej do publicznej jej obrony.

*Do wyłączenia publicznej obrony p. Angeliki Kwiatkowskiej
stawiam wniosek o wyłączenie
rozprawy doktorskiej.
28.03.2018*

