

Prof. dr hab.inż. Stanisław Błazewicz  
30-611 Kraków  
ul. Sas-Zubrzyckiego 2/8

Kraków 26.04.2018

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej mgr Anny Grzeczkowicz**

**z tytułu: „Immobilizacja materiału biologicznie aktywnego z wykorzystaniem nano-cienkiej membrany dla celów terapeutycznych”**

#### **1. Podstawa opracowania**

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz d.s. Naukowych prof. dr hab. Jacka Waniewskiego, z dnia 12.03.2018 r., z prośbą o wykonanie recenzji załączonej pracy zgodnie z Ustawą o Stopniach i Tytule Naukowym z 14 marca 2003 r. Recenzja została zredagowana zgodnie z wytycznymi opracowanymi przez Radę Naukową IBIB z dnia 5 listopada 2013 roku.

#### **2. Forma rozprawy doktorskiej i jej zagadnienie naukowe**

Rozprawa doktorska mgr Anny Grzeczkowicz została wykonana pod kierunkiem dr hab.inż. Ludomiry Granickiej, profesora Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN w Warszawie. Rozprawa stanowi zestaw pięciu, wieloautorskich prac, w tym 3 prac opublikowanych, jednego manuskryptu zaakceptowanego do druku i jednego manuskryptu przygotowanego do publikacji, spójnych tematycznie, pod wspólnym tytułem „*Immobilizacja materiału biologicznie aktywnego z wykorzystaniem nano-cienkiej membrany dla celów terapeutycznych*”. Zakres tematyczny tych prac będących przedmiotem rozprawy dotyczył opracowania zestawu biogodnych membran o grubościach nanometrycznych do budowy układów do regulacji procesów biologicznych. W dokumentacji rozprawy znajdują się kopie 5 artykułów opublikowanych i przeznaczonych do publikacji, stanowiących osiągnięcie naukowe, a także załącznik zawierający oświadczenia współautorów poszczególnych artykułów informujące o ich wkładzie merytorycznym.

Pierwsza publikacja zatytułowana „*The experimental study of the performance of nano-thin polyelectrolyte shell for dental pulp stem cells immobilization*” dotyczy układu do

wspomagania odbudowy miazgi zęba zawierającego nanocienką membranę do immobilizacji komórek macierzystych miazgi i przeznaczoną do współpracy z materiałami stosowanymi w stomatologii. Zadaniem tego układu jest umożliwienie transportu substancji produkowanych przez komórki w obrębie leczonego miejsca, przy jednoczesnym odseparowaniu komórek od bakterii występujących w jamie ustnej. Praca została opublikowana w czasopiśmie Journal of Nanoscience and Nanotechnology i według listy Journal Citation Reports z roku publikowania pracy Impact Factor tego czasopisma, wynosi 1,483, natomiast wg listy publikacji punktowanych MNiSW 20 punktów. Udział Doktorantki, będącej pierwszym autorem w powstanie tej publikacji wg załączonej dokumentacji przedstawiającej w sposób opisowy wkład poszczególnych autorów, jest dominujący.

Druga praca zatytułowana „*Cytotoksyczność materiału Nanocare Gold w badaniu in vitro-badania pilotażowe*” dotyczyła określenia cytotoksyczności materiału Nanocare Gold, w obecności wybranych systemów wiążących do wypełnień ubytków w warunkach *in vitro*. Praca ta została opublikowana w czasopiśmie Dental and Medical Problems, wydawanym przez Polskie Towarzystwo Stomatologiczne. Czasopismo to jest na liście czasopism punktowanych MNiSW z liczbą punktów 11 za rok 2015, a Index Copernicus wynosi 109,28. Doktorantka jest drugim autorem publikacji i jej udział w powstanie tej pracy podany opisowo jest porównywalny z pozostałymi autorami.

Trzecia praca przyjęta do druku i zatytułowana „*An initial evaluation of cytotoxicity, genotoxicity an antibacterial effectiveness of a disinfection liquid with silver nanoparticles combined with a glass-ionomer cement and dentin bonding system*” uzupełnia tematykę poprzedniej pracy, i dotyczyła oceny żywotności i funkcji sekwestracyjnych komórek macierzystych miazgi zęba w odpowiedzi na środek dezynfekujący zawierający nanocząstki srebra i złota, różne systemy wiążące i ich połączenie ze środkiem dezaktywującym. Praca została przyjęta do druku w czasopiśmie Advances in Clinical and Experimental Medicine, w roku 2016. Czasopismo wydawane jest przez Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Na liście czasopism punktowanych MNiSW czasopismo figuruje z liczbą punktów 15 za rok 2016, a Index Copernicus wynosi 155,19. Impact factor tego czasopisma wg Journal Citation Reports z roku 2016, wynosi 1,179. Publikacja ta powstała w wyniku współpracy 10 autorów, a udział Doktorantki w jej powstanie można uznać za porównywalny z pozostałymi autorami.

Kolejna praca pt. „*Detection of nano-thin polyelectrolyte shells on biological material*”, opublikowana w czasopiśmie *Membranes and membrane processes in Environmental Protection. Monographs of the Environmental Engineering Committee, PAN*, opisuje obecność i właściwości powłok mebranowych na enkapsulowanych komórkach, przy zastosowaniu różnorodnych technik. Udział Doktorantki w badaniach i powstanie tej publikacji jest znaczący, począwszy od jej udziału w zaprojektowaniu badań, doświadczeniach dotyczących hodowli komórkowych, badań przy użyciu różnych metod badawczych, do udziału w opracowaniu wyników manuskryptu. Czasopismo wydawane jest przez Polską Akademię Nauk i nie znajduje się na liście czasopism punktowanych.

Ostatni, piąty manuskrypt pt. „*Polyelectrolyte membrane scaffold for neural cells growth sustaining*” dotyczy badań nad wytwarzaniem i oceną przydatności polielektrolitowych rusztowań polimerowych do immobilizacji i hodowli komórkowych. Praca zawiera wyniki badań hodowli komórek neuralnych. Jest to dość obszerna praca eksperymentalna, a na podstawie oświadczenia Promotora, udział Doktorantki w jej powstanie można uznać za dominujący. Jest to manuskrypt jeszcze przed wysłaniem do publikacji. Doktorantka brała udział we wszystkich etapach powstawania tej pracy.

Dokumentacja rozprawy zawiera oświadczenia współautorów poszczególnych prac, jak i oświadczenia Promotora, prof. Ludomiry Granickiej przedstawiającej opisowo wkład Doktorantki w prace stanowiące treść jej rozprawy. Sumaryczny Impact Factor części publikacji stanowiących rozprawę doktorską, według listy Journal Citation Reports z roku publikowania pracy, wynosi 2,662.

Zagadnienie naukowe podjęte w rozprawie Autorka formułuje w formie celu i tezy pracy. Autorka postawiła sobie za cel opracowanie biozgodnej nano-cienkiej membrany do immobilizacji materiału biologicznego, jako elementu układu mającego przeznaczenie do regulacji procesów biologicznych, w tym ukierunkowanego/selektywnego wzrostu komórek.

Autorka w opracowaniu stanowiącym wprowadzenie do publikacji stawia dwie tezy związane z planowanym celem głównym, tj. opracowanie membrany polielektrolitowej, o wymiarze nanometrycznym zawierającej warstwę z modyfikowanego alginianu z inkorporowaną białkiem A i fulerenolem, która jest biozgodna, zapewnia zwiększenie wytrzymałości mechanicznej powłoki oraz pozwala na funkcjonowanie nanoenkapsulowanych ludzkich komórek macierzystych miążgi zęba w warunkach *in vitro*. Według drugiej tezy, która jest uzupełnieniem

pierwszej, wymieniona wielowarstwowa membrana, w której warstwa podstawowa zbudowana jest z polielektrolitów pochodzenia naturalnego i pozwala na potrzymanie funkcji szczurzych neuronów *in vitro* i selektywny wzrost komórek neuralnych.

**3. Czy w rozprawie przeprowadzono w sposób właściwy analizę źródeł, w tym literatury światowej, stanu wiedzy i zastosowań w przemyśle, świadczący o dostatecznej wiedzy autorki. Czy wnioski z przeglądu źródeł sformułowano w sposób jasny i przekonujący?**

Uzupełnieniem zbioru publikacji, stanowiących rozprawę doktorską jest przewodnik, zawierający ogólny opis wyników prezentowanych w wymienionych publikacjach, poszerzony o dodatkowe komentarze. Autorka cytuje w tym opracowaniu 60 pozycji literaturowych, tematycznie związanych z prowadzonymi badaniami własnymi. Biorąc pod uwagę wymogi czasopism, w których opublikowane zostały wyniki badań i konieczność dostosowania do nich doboru i adekwatności źródeł bibliograficznych, uważam, że analiza literatury poprzedzająca własne badania jest odpowiednio dobrana i świadczy o dostatecznej wiedzy i odpowiednim przygotowaniu merytorycznym Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Tematyka badawcza Doktorantki jest nowa i zagadnienia dotyczące m.in. technik pomiarowych, metod wytwarzania materiałów na podłoża w hodowlach komórkowych o wymiarach manometrycznych, o jednorodnej budowie i powtarzalnych właściwościach są ciągle przedmiotem intensywnych badań o charakterze podstawowym. W części wprowadzającej do każdej publikacji, analizowane są wybrane pozycje literaturowe, które poprzedzają uzasadnienie podjęcie się konkretnego zagadnienia przedstawionego w formie celu pracy.

**4. Czy autorka rozwiązała poprawnie postawione zagadnienie, czy użyła właściwej do tego celu metody i czy przyjęte założenia są uzasadnione?**

Cele i metody są jasno opisane nakreślone w poszczególnych artykułach. Autorzy poszczególnych artykułów przedstawiają własne cele na tle właściwie dobranej literatury prezentującej aktualny stan wiedzy. Metody wykorzystane są adekwatne do celów sformułowanych w poszczególnych artykułach.

**5. Na czym polega oryginalność rozprawy, co stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autorki, jaka jest pozycja rozprawy w stosunku do stanu wiedzy, czy poziomu techniki reprezentowanych przez literaturę światową?**

Tematyka badawcza rozprawy mieści się w obszarze inżynierii biomateriałów i inżynierii tkankowej i dotyczy opracowania kompozycji materiałowych do wytwarzania membran o wymiarach nanometrycznych jako materiałów i konstrukcji immobilizujących materiały biologiczne. Układy takie mają służyć jako funkcjonalne systemy do wspomagania selektywnego wzrostu komórek. Tematyka ta mieści się także w obrębie takich pojęć jak biomateriały, nanomateriały i nanomedycyna. Jest to dzisiaj niezwykle dynamicznie rozwijająca się dziedzina wiedzy ukierunkowana na opracowanie nowych metod leczenia tkanek i narządów. Z tego względu wiele publikowanych prac z tego zakresu ma charakter rozpoznawczy, i ciągle jest to faza weryfikacji lub uzupełniania gromadzonej wiedzy. Prace publikowane Autorki w dużym stopniu należą do tych, które pogłębiają istniejącą wiedzę w zakresie wytwarzania i charakterystyki materiałów na podłoża komórkowe, w szczególności w formie membran o wymiarach nanometrycznych. Niektóre wyniki badań doświadczalnych, które prowadzone były wspólnie z innymi autorami, można uznać za oryginalne, m.in. hodowle nano-opłaszczonych komórek macierzystych miazgi zęba, w aspekcie możliwości opracowania systemu zawierającego materiały stomatologiczne, czy niektóre wyniki badań dotyczące poznania mechanizmów oddziaływania i funkcjonowania neuronów na syntetycznych podłożach o wymiarach nanometrycznych. Poziom naukowy czasopism, w których publikowane są wyniki badań Autorki można uznać za dobry (Journal Nanosci.Nanotechnol., Adv.Clin.Exp. Med.) i akceptowalny, dotyczący tych, które indeksowane są wg listy MNiSW.

**6. Czy autorka wykazała umiejętność poprawnego przedstawienie uzyskanych wyników i ich interpretacji?**

Jak już wspomniano, biorąc pod uwagę wymogi czasopism dotyczące przygotowania manuskryptów, będących osiągnięciem naukowym Doktorantki, a także fakt, że cztery z nich zostały już poddane ocenie pod względem formalnym i merytorycznym przez ekspertów w danej dziedzinie, można uznać, że zarówno prezentacja wyników, ich interpretacja, wraz z dobrze udokumentowaną analizą statystyczną wyników eksperymentalnych nie budzą zastrzeżeń. Autorka wykazała się dostateczną wiedzą i umiejętnością w posługiwaniu się nowoczesnymi

technikami badawczymi, co zostało dodatkowo wyszczególnione w części dotyczącej opisu treści publikacji. Wspólnie z innymi autorami przeprowadziła odpowiednie badania dla realizacji celu i wykazania postawionych tez w poszczególnych publikacjach i manuskrypcie. Badania wykonane zostały na dobrym poziomie naukowym

#### **7. Jakie są słabe strony rozprawy i ewentualnie jej główne wady?**

Słabszą stroną dokumentacji będącej rozprawą doktorską jest fakt, że jeden z manuskryptów nie został jeszcze opublikowany. Zgodnie z wymaganiami ustawy spójne tematyczne publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej powinny zostać opublikowane lub zaakceptowane do publikacji w czasopismach indeksowanych. Z tego względu manuskrypt piąty nie powinien być uwzględniany w zestawie prac. Ponadto, dokumentacja dotycząca oceny udziału Doktorantki w poszczególne prace publikowane nie jest łatwa do określenia rzeczywistego jej udziału. Wszystkie artykuły są dziełem kilku autorów, np. pozycja 3 jest pracą 10 osób, a udział niektórych autorów wg dokumentacji wydaje się być porównywalny z udziałem Doktorantki. Uważam, że podanie szacunkowego parametru ilościowego, wyrażającego wkład Doktorantki w powstanie poszczególnych publikacji znacznie ułatwiłby jednoznaczną ocenę. W dokumentacji dotyczącej oświadczeń Doktorantki znajduje się jedno oświadczenie dotyczące publikacji nie będącej w zbiorze 5 artykułów wymienionych na początku dokumentacji, tj publikacji w czasopiśmie *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, z 2014.

#### **8. Co wniosła rozprawa do nauki i/lub techniki?**

Badania, w których uczestniczyła Doktorantką miały charakter eksperymentalny i nakierowane były na możliwości praktycznego wykorzystania opracowanych biozgodnych membran do immobilizacji komórek, a w perspektywie do opracowania elementu systemu zawierającego materiał stomatologiczny. Rezultaty badań opublikowane w pracach będących rozprawą doktorską Anny Grzeczkwicz pogłębiają wiedzę dotyczącą wybranych rozwiązań immobilizacji komórek, w warunkach umożliwiających ich właściwe funkcjonowanie w miejscu implantacji. Doktorantka, w opublikowanych pracach współautorskich, zaproponowała nowe układy do immobilizacji komórek za pomocą nanocienkich membran polielektrolitowych. W szczególności zaproponowane zostały systemy materiałowe do nano-opłaszczania macierzystych

komórek miazgi zęba oraz immobilizacji izolowanych komórek neuralnych na podłożu zbudowanym z polielektrolitowej membrany o wymiarach nanometrycznych. Efekt praktyczny tych badań może być wykorzystany do zastosowania opracowanych układów do odbudowy miazgi zęba. Badania wykazały, że opracowana wielowarstwowa nanopowłoka polielektrolitowa pochodzenia naturalnego pozwala na podtrzymanie funkcji neuronów *in vitro* i na selektywny wzrost komórek neutralnych *in vitro*. Jak do tej pory ukazało się niewiele prac, mających charakter badań wstępnych, które dotyczyły immobilizacji komórek macierzystych miazgi zęba (DPSC-dental pulp stem cells) przy użyciu nanoekapsulacji. Dlatego wyniki badań przedstawione w publikacji *The experimental study of the performance of Nano-thin polyelectrolyte shell for dental pulp stem cells immobilization* z roku 2015 można uznać za oryginalne.

#### **9. Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne, piśmiennictwo uzupełniające**

Z uwagi na formę rozprawy, jej dokumentację opisującą dorobek publikacyjny stanowiący rozprawę uważam, że Doktorantka jest osobą o odpowiedniej wiedzy merytorycznej i przygotowaniu w zakresie inżynierii biomateriałów, chemii i biologii, potrafiąca umiejętnie wykorzystywać nowoczesne metody badań, adekwatne do podjętej problematyki. Dokumentacja rozprawy; grafika, jakość rysunków i mikrofotografii, opisy rozdziałów są poprawne. Komentarze zawarte w części poprzedzającej zbiór publikacji są napisane poprawnie pod względem językowym, z zachowaniem odpowiedniej terminologii dotyczącej podjętej problematyki.

Pytania i problemy mające charakter dyskusyjny, które nasunęły mi się przy studiowaniu dokumentacji rozprawy dotyczą dwóch kwestii;

- na stronie 20 Autorka pisze w swoim komentarzu, że „nanocienka wielowarstwowa membrana polielektrolitowa, zawierająca warstwę z modyfikowanego alginianu z inkorporowaną białkiem A i fulerenolem, jest biozgodna i zapewnia zwiększenie wytrzymałości mechanicznej powłoki”. Badania te prezentowane są w publikacji pt. *Detection of nano-thin polyelectrolyte shells on biological materials*, 2014. Termin „zwiększenie wytrzymałości mechanicznej powłoki” pojawia się także na stronie 17 w sformułowanej pierwszej tezie pracy. Wytrzymałość mechaniczna materii (syntetycznej, naturalnej, biologicznej) jest pojęciem ściśle zdefiniowanym i ma wymiar

naprężenia. Co rozumie Doktorantka poprzez takie określenie, i czy rzeczywiście udało się Doktorantce wyznaczyć ten parametr dla badanej powłoki?

- na stronie 22 Doktorantka pisze, że celem badań dotyczących immobilizacji komórek na podłożu było opracowanie wielowarstwowego polielektrolitowego nanorusztowania membranowego, pozwalającego na ukierunkowany wzrost, z możliwością prowadzenia hodowli długoterminowej. W konkluzji Doktorantka stwierdza, że wspomniana membrana pozwala na podtrzymanie funkcji neuronów i jednocześnie pozwala na selektywny wzrost komórek neutralnych *in vitro*. W terminologii związanej z hodowlą komórkową na podłożu, rusztowaniu odróżnia się pojęcia „selektywność”, „ukierunkowany wzrost”. Jak te pojęcia interpretuje Doktorantka? Wydaje się, że ukierunkowany wzrost komórek wymagałby zastosowania podłoża o specyficznej budowie przestrzennej, charakteryzującego się anizotropową mikrostrukturą.

#### **10. Jak recenzent ocenia rozprawę?**

Uważam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. .

#### **Wniosek końcowy**

Podsumowując przedstawioną dokumentację, zawierającą osiągnięcie naukowe mgr Anny Grzeczkoicz, tj. zestaw pięciu prac, w części opublikowanych lub zaakceptowanych do publikacji, uważam, że spełnia ona wymogi rozprawy doktorskiej. Doktorantka jest pierwszym bądź drugim autorem w tych publikacjach, a jej udział w każdej z nich jest znaczący.

Prace opublikowane znajdują się w czasopismach naukowych, w większości znajdujących się na liście punktowanej MNiSW, a także w bazie Web of Science. Recenzowana praca zawiera dostatecznie udokumentowane i wykonane wyniki badań eksperymentalnych, dotyczących wytwarzania biozgodnych i biofunkcjonalnych membran o wymiarach nanometrycznych, które w perspektywie będą mogły służyć jako elementy systemu materiałów stomatologicznych. Uważam, że rozprawa spełnia wymogi ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki.

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Annę Grzeczkoicz do publicznej obrony rozprawy.

