

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Mgr inż. Moniki Drabik**

### **pt. Nanokompozytowa membrana do immobilizacji materiału biologicznie aktywnego dla celów biomedycznych**

#### **1. Forma rozprawy, zakres merytoryczny, tezy i charakter pracy.**

Rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Drabik została wykonana w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Maciej Nałęcz, Polskiej Akademii Nauk, pod kierownictwem Pani Profesor Ludomiry Granickiej.

Rozprawa ma typową formę rozprawy doktorskiej, rozpoczyna się od części teoretycznej, opisującej stan wiedzy, po której następuje przedstawienie celu i tezy pracy, następnie, w części doświadczalnej Autorka, w oparciu o liczne eksperymenty i wyciągane na ich podstawie wnioski, weryfikuje postawione wcześniej tezy. Rozprawa kończy się obszernym podsumowaniem, w którym Autorka przedstawia otrzymane wyniki i omawia je w kontekście szeregu aktualnych danych literaturowych, dotyczących opracowanych przez nią zagadnień. Praca jest monografią o charakterze interdyscyplinarnym, wpisującą się zagadnienia, związane z inżynierią biomedyczną i została opracowana na podstawie wyników już opublikowanych, jak i niepublikowanych. Trzy rozdziały rozprawy oparte są w całości na opublikowanych artykułach, których Doktorantka jest współautorką.

Tematyka rozprawy dotyczy badań nad problemem, jakim jest wytworzenie materiałów dla zastosowań medycznych, charakteryzujących się równocześnie biozgodnością w kontakcie z komórkami oraz właściwościami antybakteryjnymi. Tezy pracy zostały szczegółowo przedstawione i obejmują opisy złożonych układów materiałowych, które mają wykazywać tego rodzaju właściwości. Można zatem stwierdzić, że Autorka w swoich badaniach zamierzała wykazać, że stosując odpowiednie metody wytwórcze oraz dobierając odpowiednio skład komponentów materiałowych można otrzymać biomateriały, które będą charakteryzować się biozgodnością w kontakcie z komórkami tkanek, jak i bakteriobójczością. Praca ma charakter eksperymentalny i zawiera wiele wyników, które wskazują na ich potencjał aplikacyjny.

#### **2. Część teoretyczna rozprawy – analiza literatury i aktualnego stanu wiedzy.**

Rozprawa rozpoczyna się od części teoretycznej, wprowadzającej w zagadnienia, związane z tematyką pracy. W tej części przedstawione zostały podstawy inżynierii biomateriałów, jak również skupiono się nad zagadnieniami, związanymi z metodami leczenia ran skóry oraz ubytków tkanki kostnej. W tej części pracy zostały omówione aktualne kierunki badań, metody leczenia trudno gojących się ran, regeneracji ubytków tkanki kostnej, jak również zagadnienia traktujące o antybakteryjnych właściwościach nanocząstek metali. Ta część pracy opracowana została na podstawie

wybranych, licznych pozycji literaturowych, kluczowych dla tej dziedziny nauki, jak i aktualnych publikacji, dotyczących obszaru inżynierii biomateriałów. Na początku tej części pracy Autorka przypomina podstawowe definicje związane z podjętą tematyką rozprawy i następnie wskazuje na istotne fakty, uzasadniające celowość i konieczność podejmowania badań nad biogodnymi materiałami do zastosowań medycznych, które jednocześnie cechują bakteriobójczością. Lektura tej części pracy jednoznacznie wskazuje, że Autorka posiada odpowiednie przygotowanie merytoryczne i wiedzę, które są niezbędne do realizacji planowanych doświadczeń.

### **3. Część eksperymentalna – ocena realizowanych zagadnień i metod wykorzystanych do ich weryfikacji – poprawność wyciągniętych wniosków, sposób przedstawiania wyników i formowania wniosków**

Weryfikacja tez sformułowanych przez Doktorantkę polegała na odpowiednio zaplanowanych i wykonanych eksperymentach, które realizowała przy pomocy prawidłowo dobranych metod wytwarzania i oceniała stosując narzędzia fizykochemii ciała stałego i testy *in vitro* w kontakcie z wybranymi liniami komórkowymi i szczepami bakterii, zgodne z obowiązującymi standardami.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Drabik zawiera cztery rozdziały, przy czym trzy z nich mają podobną strukturę i dotyczą membran o właściwościach antybakteryjnych, charakteryzujących się biogodnością z wybranymi liniami komórkowymi. W tych trzech rozdziałach Autorka stosowała podobne metody badawcze, a różnice związane były z rodzajem metody wytwarzania membran oraz na doborze i rodzajem użytych modyfikatorów. Pierwsze rozdziały zawierają wyniki doświadczeń nad wytworzeniem i charakterystyką membran kolagenowych, modyfikowanych nanocząstkami srebra. Membrany zawierające różne ilości AgNPs charakteryzowane były za pomocą badania kąta zwilżania i przepuszczalności oraz kontaktowane były z komórkami. Uzyskano szereg wartościowych wyników wskazujących, że obrona droga może prowadzić do uzyskania wartościowych materiałów dla określonych zastosowań, między innymi w leczeniu trudno-gojących się ran, przy zachowaniu pewnej, granicznej ilości modyfikatora, wprowadzanego do membrany kolagenowej.

Przedmiotem badań przedstawianych w rozprawie była również grupa membran, wytworzonych metodą warstwa po warstwie na bazie polietylenoiminy (PEI). Materiały te modyfikowano nanocząstkami złota AgNPs, nanocząstkami srebra AuNPs i dodatkowo fosforanem wapnia. W ten sposób wytworzono grupę membran i podobnie, jak w poprzednim rozdziale zastosowano metodę kąta zwilżania i oznaczono ich przepuszczalność. Jednakże, w odróżnieniu do poprzedniego rozdziału, zastosowano dodatkowo metody mikroskopowe w analizie membran oraz komórek adherujących do ich powierzchni, przeprowadzono również ocenę bakteriobójczości, kontaktując komórki bakteryjne z roztworami PEI-Ag i PEI-Au. Wyniki opisane w tej części pracy zostały prawidłowo zinterpretowane, a ich efektem było uzyskanie szeregu cennych danych w zakresie wytwarzania i budowy biogodnych podłoży tkankowych, a dodatkowo mających właściwości antybakteryjne.

W najobszerniejszym rozdziale rozprawy opisane zostały membrany (PEI) modyfikowane, oprócz AuNPs i hydroksyapatytu, również cząstkami fullerenolu. W rozdziale tym zawarto szereg informacji związanych z badaniami adhezji komórek i ich żywotności oraz przeprowadzono analizę wpływu zastosowanych dodatków na morfologię komórek. Przeprowadzono także złożone eksperymenty, dotyczące oceny internalizacji modyfikowanych cząstek złota do wnętrza komórek. Dzięki tak

przeprowadzonym eksperymencie, Doktorantka opracowała układy membranowe o pożądanych właściwościach, tj. biogodne i antybakteryjne, a jednocześnie badania te pozwoliły na sformułowanie pewnych, ogólnych wniosków, dotyczących konstrukcji tego rodzaju podłoży tkankowych. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę jednoznacznie wskazują, że odpowiednia funkcjonalizacja cząstek o działaniu bakteriobójczym może ograniczać ich wnikanie do wnętrza komórki oraz, że modyfikowanie podłoży komponentem bioaktywnym pozytywnie wpływa na odpowiedź komórkową.

Rozdział 7 dotyczy innych zagadnień niż te, które opisywane są w pozostałych trzech, niemniej jednak jest on merytorycznie z nimi związany. Wyniki, dotyczące aktywności mitochondrialnej komórek kontaktowanych z nanocząstkami złota AuNPs, modyfikowanymi poli-L-lizyną, w zasadzie potwierdzają wnioski z rozdziału 9, wskazując na kluczową rolę sposobu modyfikacji nanocząstek antybakteryjnych i jej wpływu na odpowiedź komórkową. Tego rodzaju dane mogą mieć znaczenie dla wielu zastosowań, w tym w zakresie wytwarzania biogodnych podłoży i równocześnie charakteryzujących się antybakteryjnością. Podsumowując, można stwierdzić, że zaplanowane w pracy doświadczenia zostały prawidłowo przeprowadzone, a osiągnięte wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski pozwoliły pozytywnie zweryfikować postawione tezy pracy.

#### **4. Oryginalność rozprawy, aktualność tematyki status uzyskanych wyników w odniesieniu do stanu wiedzy**

Zakres merytoryczny pracy wpisuje się w niezwykle aktualną obecnie tematykę, jaką są tworzywa o właściwościach bakteriobójczych czy bakteriostatycznych, w aspekcie zastosowań w inżynierii biomateriałów. Materiały o właściwościach antybakteryjnych i równocześnie charakteryzujące się biogodnością oraz potencjałem w zakresie regeneracji tkanek, to obecnie grupa stanowiąca przedmiot bardzo intensywnych badań. Zatem dorobek naukowy Autorki należy uznać za odpowiadający aktualnym kierunkom badań inżynierii biomateriałów, a również jako posiadający przyczynę pogłębiający wiedzę w zakresie doboru substratów wykorzystywanych do wytwarzania układów kompozytowych, w szczególności odnoszący się do wyników, które związane są z rozbudowanymi i dobrze zaplanowanymi eksperymentami z udziałem testów na wielu liniach komórkowych, prowadzonych w warunkach *in vitro*. Wyniki te nie tylko dotyczyły podstawowej oceny biogodności, ale wykazały także istotne różnice wpływu poszczególnych modyfikatorów na zachowanie różnego typu komórek, łącznie z danymi w zakresie internalizacji antybakteryjnych elementów do ich wnętrza.

#### **5. Pytania i problemy dyskusyjne dotyczące rozprawy, uwagi merytoryczne i redakcyjne.**

Jak każde tego rodzaju opracowanie naukowe, rozprawa doktorska pani mgr inż. Moniki Drabik zawiera pewne kwestie, które wymagają wyjaśnienia. Niemniej jednak trzeba zaznaczyć, że zawarte uwagi można również traktować jako ewentualne sugestie, które mogą być uwzględnione w kolejnych pracach, związanych z tematyką podłoży tkankowych, posiadających z jednej strony właściwości antybakteryjne, z drugiej zaś, sprzyjające aktywowaniu procesów regeneracyjnych.

Praca zawiera interesujące, szeroko rozbudowane badania biologiczne w warunkach *in vitro*, natomiast odnosi się wrażenie, że w niektórych rozdziałach znacznie mniej uwagi poświęcono charakterystyce fizyko-chemicznej i mikrostrukturalnej materiałów, która głównie odnosi do analizy kąta zwilżania. Wiadomo, że reakcja komórek na powierzchnie materiału zależy nie tylko od wielkości kąta zwilżania, ale jest również wypadkową jego nano- i mikro- topografii, jak i chemii powierzchni.

Takie informacje Doktorantka omawiała w części wstępnej rozprawy opisującej stan wiedzy. Wiadomo również, że wprowadzanie nanocząstek do matrycy polimerowej powoduje jej modyfikacje na poziomie molekularnym. Zatem, poszerzenie zakresu badań mikroskopowych, jak i przeprowadzenie badań spektroskopowych, a także badań degradacji membran, mogłoby wzbogacić interpretację wyników badań biologicznych uzyskanych w pracy. Wydaje się, że praca zyskała by na wartości gdyby, obok wyznaczenia swobodnej energii powierzchniowej, podano także jej składowe, tj składową dyspersyjną i polarną, co mogłoby dostarczyć oryginalnych danych w zakresie odpowiedzi komórkowej. Praca doktorska jest bardzo obszerna, jednak rozbudowanie badań w zakresie właściwości antybakteryjnych, zwłaszcza w wypadku membran kolagenowych, mogłoby w pełni potwierdzić ich potencjał dla planowanych zastosowań. Autorka wykazała, że w zależności od rodzaju podłoża zmienia się znacząco kąt zwilżania, jednak niekiedy można odnieść wrażenie, że do badań biologicznych wykorzystywano membrany osadzone na innej powierzchni niż te, które badano w zakresie kąta zwilżania.

W zakresie uwag redakcyjnych praca zawiera pewne nieprofesjonalne, jak i błędne sformułowania, takie jak np.: trudno zrozumieć, co Autorka miała na myśli pisząc: *interfejs kość-skóra* lub *interfejs osteoblast-fibroblast* lub *interakcja implantu z tkanką żywiciela*, lub podając, że stosowano *roztwór hydroksyapatytu* – hydroksyapatyt jest substancją trudno rozpuszczalną i nie tworzy roztworu, a raczej tworzy zawiesinę zdyspergowanych cząstek w środowisku wodnym. Powyższe uwagi nie umniejszają mojej jednoznacznie pozytywnej oceny rozprawy.

## **6. Wniosek końcowy -wkład rozprawy do nauki.**

Wyniki uzyskane w recenzowanej pracy doktorskiej, zwłaszcza w zakresie analizy zachowania się różnych typów komórek na podłożach modyfikowanych nanocząstkami antybakteryjnymi, wraz z elementami wpływającymi na parametry membran w zakresie ich biogodności, stanowią istotny przyczynek pogłębiający wiedzę związaną z konstrukcją wielofunkcyjnych podłoży tkankowych.

Dane uzyskane w rozprawie można również traktować jako wstępny etap w zakresie badań mających na celu opracowanie nowego rodzaju membran dla praktyki klinicznej.

Podsumowując, uważam że przedstawiona praca, zawierająca osiągnięcie naukowe Doktorantki spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Recenzowana praca zawiera dobrze udokumentowane i rzetelnie wykonane wyniki badań eksperymentalnych, dotyczących charakterystyki nowego rodzaju biomateriałów.

Uważam, że rozprawa spełnia wymogi Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym (Dz. U. z 2003. Nr 65 poz.595; z późn. zm.).

Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Drabik do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

