

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Jagiełło, pt.:

**Biomedyczny potencjał grafenu płatkowego,**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Ludwiki Lipińskiej

### Tematyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinary i rozszerza zakres wiedzy w inżynierii materiałowej, chemii oraz naukach medycznych. Praca wpisuje się w bardzo aktualny i dynamicznie rozwijający się kierunek badań nad wykorzystaniem nanostruktur, w tym nanostruktur grafenowych, w medycynie.

Celem rozprawy było określenie możliwości zastosowania grafenu płatkowego w dwóch obszarach biomedycznych: tkankowej inżynierii regeneracyjnej oraz terapii nowotworowej.

### Analiza strony merytorycznej rozprawy

Doktorantka w zwięzły sposób wprowadza w podjętą tematykę badawczą, podkreślając jej znaczenie oraz popierając potrzebę badań wskaźnikami zachorowalności i śmiertelności spowodowanych nowotworami, ale niestety powołując się na dane, w tym WHO i IARC, nie odwołuje się do żadnych źródeł. Projektując badania w obszarze inżynierii tkankowej w medycynie regeneracyjnej oraz terapii nowotworowej, stawia sobie za cel naukowy uzyskanie odpowiedzi na sześć pytań:

- ✓ Która forma grafenu płatkowego wykaże biozgodność z komórkami macierzystymi?
- ✓ Czy grafen płatkowy może być wykorzystany w hodowli komórkowej?
- ✓ Jak funkcjonalizować grafen płatkowy bioaktywnymi modyfikatorami nieorganicznymi i organicznymi?

- ✓ Jak funkcjonalizacja ta wpłynie na wybrane hodowle komórkowe?
- ✓ Czy grafen płatkowy spowoduje apoptozę komórek nowotworowych?
- ✓ Jak różne metody sterylizacji wpłyną na strukturę grafenu?

W zakresie badań związanych z inżynierią tkankową Doktorantka uwzględniła wytworzenie grafenu płatkowego o różnych parametrach strukturalnych, jego bioaktywną funkcjonalizację, charakteryzację właściwości wytworzonych materiałów oraz przeprowadzenie podstawowych badań komórkowych na mezenchymalnych komórkach macierzystych (hUC-MSCs) i komórkach linii L929, w oparciu o grafen płatkowy wyselekcjonowany na podstawie wyników badań własnych.

W zakresie terapii nowotworowej prace objęły badania możliwości modyfikacji grafenu płatkowego zróżnicowanymi związkami wspomagającymi działanie antynowotworowe oraz przeprowadzenie wstępnych badań na komórkach nowotworowych glejaka U87.

Doktorantka uwzględniła także istotny aspekt sterylizacji, niezbędnej w przypadku tego rodzaju materiałów biomedycznych. Bez doboru właściwych warunków sterylizacji, wcześniejsze etapy badań nie mogłyby się przełożyć na kontynuację w aspekcie aplikacyjnym, a to jest celem biomedycznej inżynierii materiałowej.

Tak założony program badań został zrealizowany z wykorzystaniem adekwatnych, zaawansowanych metod badawczych, zarówno pod kątem analizy właściwości fizyko-chemicznych opracowywanych materiałów grafenowych, jak również ich ukierunkowanej aktywności biologicznej. Jest to bardzo istotne, ponieważ na podstawie badań, zgodnie z wypracowanymi strategiami i zaleceniami, między innymi OECD (np. <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>), badania nad wykorzystaniem nanomateriałów w aplikacjach biologicznych i ich ocena toksykologiczna, wymaga między innymi pełnej charakterystyki fizyko-chemicznej.

Sposób przedstawienia wyników oraz ich interpretacja w zdecydowanej większości nie budzi zastrzeżeń, a podsumowanie i wnioski są poparte wynikami badań. Istotną wartość wnosi też odnośnienie się do już opublikowanych wyników badań w recenzowanych czasopismach, których Doktorantka jest współautorką, co stanowi o ich pozytywnym zweryfikowaniu przez ekspertów.

Niektóre aspekty są jednak niedopracowane. Na Rys. 97 i 98 przedstawiono dwie wersje graficzne tych samych wyników, co nie jest potrzebne, ponieważ wersja B daje pełną informację (str.152 i 153). Można się było ewentualnie pokusić o wyznaczenie kinetyki zmian. Brak też w tej części pracy omówienia statystycznej istotności różnic. Jednocześnie wnioski z tych badań są zbyt ogólne. O ile stwierdzenie, że materiał grafenowy GO można stosować do hodowli komórek jako alternatywę dla podłoży polistyrenowych, można uznać za poprawne, to zapis dotyczący przewagi ze względu na możliwość jego modyfikacji, nie wynika z efektów akurat tej modyfikacji. Doktorantka stwierdza przecież, że „podłoże w postaci niemodyfikowanego GO ma najbardziej korzystny wpływ na hodowlę komórek linii L929”.

W przypadku hodowli komórek hUC-MSCs (rys. 86) wynika, że ich proliferacja po 72 godzinach jest najlepsza dla GO modyfikowanego nanocząstkami Au i TiO<sub>2</sub>, natomiast wyniki żywotności dla tych modyfikacji są niższe niż dla kontroli. Wykazano także negatywny wpływ GO modyfikowanego nanocząstkami srebra na proliferację. Niezrozumiała jest więc dla mnie dalsza interpretacja wyników. Co to znaczy, że „dobre parametry zachowały również komórki, dla wzrostu których podłożem był kompozyt GO-nanoAg(KA)”, skoro wyniki proliferacji i żywotności są niższe niż dla kontroli? Szkoda też, że w tej serii badań nie uwzględniono próby niemodyfikowanego GO. W opisie również brak jest oceny statystycznej istotności różnic.

### **Struktura i poprawność redakcyjna rozprawy.**

Sam układ ma charakter tradycyjny i charakterystyczny dla rozpraw z dziedziny inżynierii materiałowej, obejmujący wstęp, część teoretyczną uwzględniającą stan wiedzy w zakresie materiałów grafenowych – ich charakterystyki i metod otrzymywania, charakterystyki materiałów biologicznych, zastosowania biomedycznego materiałów grafenowych, ich funkcjonalizacji modyfikatorami organicznymi i nieorganicznymi oraz sterylizacji. Ta część rozprawy zakończona jest opisem dziewięciu wybranych metod badawczych, służących charakterystyce fizyko-chemicznej opracowanych nanostruktur grafenowych. Inne z istotnych metod, np. metoda wyznaczanie kąta zwilżania, opisane są w części eksperymentalnej, co zakłóca nieco spójność. Nie scharakteryzowano także żadnej metody dotyczącej badań biologicznych, co byłoby w tym miejscu bardzo korzystne.

Opisy są zasadniczo właściwe, ale w niektórych aspektach mało precyzyjne. Np. na stronie 41 znajduje się stwierdzenie; „Poza chemią powierzchni, również ilość warstw ma wpływ na biologiczną odpowiedź komórek”. Wpływ ten mają właściwości fizyko-chemiczne powierzchni, a nie sama chemia, co zresztą Doktorantka udowadnia w pracy. Powinno się także stosować właściwy zapis nazw szczepów bakterii (sekcja 7.1.).

W części teoretycznej pewien niedosyt związany jest ze stosunkowo oszczędnym odnoszeniem się do źródeł. I tak w przypadku AgNPs są to 2 pozycje (str. 48), AuNPs 3 poz. (str. 49), TiO<sub>2</sub> 2 poz. (str. 50), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1 poz. (str.51) i platyny również 1 poz. (str.51). Jest to o tyle zastanawiające, że piśmiennictwo na ich temat, podobnie jak układów hybrydowych, jest bardzo bogate, a właśnie takie modyfikatory były stosowane przez Doktorantkę do funkcjonalizacji materiału grafenowego. Zagadnienie sterylizacji także bazuje na 1 poz. (str. 53/54). W przypadku analizy EDS wyznaczany jest procentowy udział pierwiastków (wagowy lub atomowy), a nie stężenie ( str. 59.). Uwagi te nie mają wpływu na ocenę merytoryczną pracy, ale mam nadzieję, że będą przydatne w dalszej działalności naukowej Doktorantki.

Część eksperymentalna ma również klasyczny układ. Każdy z etapów badań eksperymentalnych został opisany, a wyniki są dobrze udokumentowane i zwięźle skomentowane, z odniesieniem w wielu miejscach do publikacji, których Doktorantka jest współautorką. Część podsumowująca zawiera sformułowania ogólne dotyczące zakresu przeprowadzonych badań oraz wnioski szczegółowe, podzielone na trzy obszary dotyczące zastosowania grafenu płatkowego w inżynierii tkankowej, zastosowanie grafenu płatkowego w terapii antynowotworowej i sterylizacji. Zarówno styl jak i szata graficzna rozprawy nie budzą zastrzeżeń. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobra jakość obrazów mikroskopowych i widm.

Kilka uchybień przedstawiam poniżej:

str.92 – jakiej wody użyto do wyznaczania kąta zwilżania, jaka była wilgotność względna powietrza, ile stosowano powtórzeń. Szkoda, że nie wyznaczono swobodnej energii powierzchniowej i jej składowych na bazie pomiarów kąta zwilżania trzema cieczami wzorcowymi. Umożliwiłoby to szerszą analizę właściwości fizyko-chemicznych powierzchni opracowywanych materiałów i interpretację dotyczącą adhezji.

str. 97 – dane dotyczące zgody komisji etycznej powinny być precyzyjne, samo określenie „właściwej komisji” jest niewystarczające,

str. 106 – określenie „plastikowe” jest kolokwialne,

str.116 – zdjęcia SEM są na rys. 51 i 52, a nie na rys. 50, na którym jest widmo EDS,

str. 131 – „po wypaleniu w wysokiej temperaturze” – tzn. w jakiej i przez jaki czas?

str. 164, Tabela 9. – Czy wyniki masy i objętości dotyczące charakterystyki guza GMB hodowanego na błonie zarodka kurzego odnoszą się do pojedynczego pomiaru?

str. 191 – Elementarna analiza spalenkowa? Brak informacji o aparaturze i metodzie badania.

str. 192 - Doktorantka w części teoretycznej odnosi się do aktywności biologicznej, w tym wobec szczepów bakterii, nanocząstek srebra, którymi również modyfikuje struktury grafenowe. Niestety, poza stwierdzeniem, „opracowano efektywną funkcjonalizację GO i rGO nanocząstkami ... o działaniu antybakteryjnym (Ag, potencjalnie Ag<sub>2</sub>O)” nie znalazłam w pracy wyników badań takiej aktywności, ani odniesienia do ew. publikacji.

łącznie rozprawa o objętości 213 stron, zawiera 128 rysunków, w tym 14 dotyczących charakterystyki wybranych metod badawczych, 15 tabel, wykaz skrótów głównych pojęć, wykaz materiałów użytych w badaniach oraz 199 pozycji bibliograficznych.

### **Wartość naukowa rozprawy.**

Pomimo wskazanych niedociągnięć, rozprawę oceniam pozytywnie, a jej wartość naukowa jest bardzo istotna. Doktorantka odpowiedziała na postawione na wstępie pytania i osiągnęła cel pracy. Badania mają charakter oryginalny i interdyscyplinarny, a ich wyniki stanowią motywację do rozszerzania wiedzy w tym zakresie. Nowatorskie aspekty wyspecyfikowane na końcu rozprawy są uzasadnione i życzę Pani magister, aby kontynuowała badania nad podjętą tematyką. Wartość naukową potwierdza dorobek naukowy Doktorantki; kierowanie 3 projektami, udział w realizacji 9 projektów, współautorstwo 22 publikacji i 4 patentów.

Należy także z uznaniem podkreślić, że realizacja programu badawczego wymagała od Doktorantki znaczącego rozszerzenia wiedzy i zrozumienia problemów oraz metodyk badawczych specyficznych dla poszczególnych dziedzin reprezentowanych w przedmiotowych

badaniach. Przedłożona rozprawa stanowi istotny wkład w rozwój własny Doktorantki, niezbędny w działalności naukowej, ale również zespołów interdyscyplinarnych, z którymi Doktorantka współpracowała.

W posumowaniu, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie **Pani mgr Joanny Jagiełło** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Cieślak