CMPW PAN

CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Marii Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze

Dr hab. inż. Piotr Kurcok, prof. CMPW PAN
Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych
Polskiej Akademii Nauk
Zabrze

Ocena pracy doktorskiej
mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki
pt.: "Elektroaktywne powierzchnie polimerowe do sterowania wzrostem biofilmu bakteryjnego i komórkowego"

Promotor: dr hab. inż. Katarzyna Krukiewicz, prof. Politechniki Śląskiej

Podstawą formalną opracowania niniejszej recenzji jest pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej, Pani prof. dr. hab. inż. Doroty Neugebauer (pismo z dnia 15.06.2022r.) oraz uchwała Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej z dnia 15.06.2022r.

Po wstępnej analizie treści rozprawy przesłanej mi przez Pana Dziekana stwierdzam, że jej tematyka jest zgodna z moimi zainteresowaniami naukowymi, co pozwala mi podjąć się opracowania recenzji merytorycznej tej rozprawy. Jednocześnie oświadczam, że nie prowadziłem i nie prowadzę z Doktorantką żadnych wspólnych badań naukowych oraz, że nie jesteśmy wspólnie autorami jakiejkolwiek publikacji naukowej.

Przedmiotem przedłożonej do recenzji pracy są elektroaktywne powierzchnie polimerowe do sterowania wzrostem biofilmu bakteryjnego i komórkowego. Obecnie, w wielu dziedzinach życia, sterylność materiałów w kontekście zdrowia i życia człowieka jest niezwykle istotna. Szczególnie ważne stało się to w ostatnich latach, gdy świat zaczął zmagać się z pandemią wywołaną koronawirusem SARS-CoV-2. Widoczny jest istotny wzrost zainteresowania środkami, które są w stanie zwalczać groźne dla życia patogeny, takie jak bakterie i wirusy. Ponadto zjawisko wytwarzania oporności przez mikroorganizmy chorobotwórcze na stosowane dotychczas środki biobójcze, w tym głównie antybiotyki, stawia badaczy przed zadaniem znalezienia nowych materiałów zapewniających sterylność. Pod tym kątem na szeroką skalę badane są materiały polimerowe, które nieraz same wykazują działanie biobójcze wobec patogenów, lub które mogą być użyte do immobilizacji związków

działających antybakteryjnie. Zatem **przedstawiona do recenzji praca** Pani mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki pt. *"Elektroaktywne powierzchnie polimerowe do sterowania wzrostem biofilmu bakteryjnego i komórkowego"* **doskonale wpisuje się w aktualne trendy badań dotyczących tego typu materiałów i jest istotna zarówno ze względów naukowych jak i potencjału aplikacyjnego otrzymywanych materiałów.**

Recenzowana praca stanowi monotematyczny cykl pięciu prac naukowych opublikowanych w ostatnich dwóch latach w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* oraz jednego opisu zgłoszenia patentowego złożonego w Urzędzie Patentowym RP. Cyklowi towarzyszy komentarz wraz z wykazem dorobku naukowego Doktorantki (pięćdziesiąt jeden stron). Dołączono również streszczenia dysertacji w języku polskim i angielskim. Należy stwierdzić, że **forma treści rozprawy jest prawidłowa i dopuszczona przez Ustawę jako rozprawa doktorska z dziedziny chemii.**

W ***Komentarzu*** na początku Doktorantka wymieniła prace wchodzące w zakres dysertacji, określiła swój wkład autorski w stanowiących cykl artykułach oraz zaprezentowała wykaz swoich pozostałych publikacji, nie wchodzących w zakres rozprawy.

Następnie we ***Wstępie***, poprzedzonym *Wykazem skrótów*, Doktorantka krótko omawia aktualne problemy związane z leczeniem chorób neurodegeneracyjnych i znaczeniu stymulacji elektrycznej w terapii wielu chorób układu nerwowego. Mogło by się wydawać, że elektrody wykonane z metali szlachetnych rozwiązują problemy związane z projektowaniem urządzeń biomedycznych dla tych zastosowań, jednakże jak przedstawiła Autorka, mechaniczne niedopasowanie pomiędzy tkanką nerwową a twardą powierzchnią metalowej elektrody jest po pewnym czasie powodem powstawania stanów zapalnych oraz degeneracji neuronów co zmniejsza skuteczność terapii. Innym problemem jest tworzenie się na powierzchni implantu biofilmu bakteryjnego, który istotnie utrudnia kontakt komórek nerwowych z elektrodą. Generalnie medycyna radzi sobie doskonale z zakażeniami bakteryjnymi przy użyciu antybiotyków jednak, jak wykazała Doktorantka w oparciu o dane literaturowe, struktura biofilmu znacznie utrudnia jego usunięcie za pomocą samego antybiotyku. Obiecującym działaniem wydaje się tutaj zastosowanie środków bakteriobójczych wraz z polem elektrycznym, a zatem materiałów z immobilizowanymi związkami biologicznie aktywnymi, co jest trudne w przypadku obecnie stosowanych biomateriałów metalicznych. Rozwiązaniem tych problemów może być użycie w tych zastosowaniach polimerów przewodzących charakteryzujących się przewodnictwem, stosunkowo dobrymi właściwościami mechanicznymi oraz biokompatybilnością z tkankami.

Następnie, w rozdziale ***Cel pracy***, w oparciu o wstęp w połączeniu z artykułem A1, Doktorantka **sformułowała w sposób jasny i w pełni zrozumiały cel zasadniczy oraz zakres podjętych badań**.

W rozdziale zatytułowanym ***Część eksperymentalna*** Autorka opisała elektrochemiczną syntezę wybranych polimerów przewodzących osadzanych na powierzchni szkła pokrytego warstwą platyny i ich modyfikację poprzez immobilizację w nich tetracykliny oraz metody użyte do oceny właściwości fizykochemicznych wytworzonych materiałów. Następnie przedstawiła sposób prowadzenia badań biologicznych z wykorzystaniem zarówno bakterii jak i linii komórkowej B35. Wszystkie stosowane metody odniesione są do poszczególnych publikacji cyklu.

Wyniki to rozdział komentarza, w którym Autorka przedstawiła w formie tabelarycznej i graficznej wyniki uzyskane w publikacjach badawczych A2, A3 i A4.

Dyskusja to kolejny rozdział komentarza, w którym konsekwentnie, podrozdział po podrozdziale Doktorantka prowadzi do zaplanowanego celu. W pierwszym etapie Autorka przeprowadziła studia literaturowe zaprezentowane w artykule A1, mające na celu określenie związku pomiędzy elektrochemią a mikrobiologią, wykazując, że pomimo wielu informacji w literaturze naukowej, potrzebne są jednak dalsze badania, aby zmierzyć się z głównym problemem związanym z prowadzącym m.in. do wzrostu rezystancji wewnętrznej i spadku gęstości mocy występującej w czasie, biofoulingiem elektrod. W literaturze istnieją doniesienia dotyczące antybakteryjnego działania metali szlachetnych zatem może się wydawać, że ogólnie stosowane pokrywanie implantów neurologicznych platyną, metalem charakteryzującym się biokompatybilnością z tkankami oraz dobrą przewodnością elektryczną, powinno rozwiązać w dużej mierze problemy potencjalnego biofilmu bakteryjnego powstającego w trakcie użytkowania. Założenie to w świetle kolejnej pracy Autorki (A2) okazało się błędne, jako że przeprowadzone i referowane badania nie tylko nie potwierdziły antybakteryjnego wpływu warstwy platyny, ale wręcz wskazywały, że istnieje ryzyko zwiększenia namnażania się bakterii na powierzchni pokrytej warstwą tego metalu. W związku z takimi wynikami Doktorantka podjęła dalsze badania mające na celu opracowanie takiej modyfikacji powierzchni platyny by zminimalizować możliwość rozwoju na niej bakterii i tworzenia biofilmu. W związku z informacjami, iż zastosowanie impulsów elektrycznych wpływa na ograniczenie tworzenia biofilmu oraz dużym zainteresowaniem skoniugowanymi polimerami jako systemami kontrolowanego dostarczania związków biologicznie aktywnych, Autorka postanowiła do modyfikacji powierzchni elektrod platynowych użyć warstwy polimeru przewodzącego i dodatkowo immobilizować w niej antybiotyk - tetracyklinę. W pracach A3 i A4, metodą polimeryzacji elektrochemicznej otrzymała cztery powłoki otrzymane z dwóch polimerów, a mianowicie: poli(3,4-etylenodioksytiofenu) (PEDOT) i poli(3,4-etylenodioksypirolu) (PEDOP) oraz z takich samych polimerów ale zawierające immobilizowaną tetracyklinę (PEDOT/Tc i PEDOP/Tc). Oczywiście aby otrzymać warstwy polimerowe o odpowiednich/dobrych właściwościach elektrycznych należało zoptymalizować zarówno stężenie antybiotyku w mieszaninie reakcyjnej jak i proces elektropolimeryzacji. Doprowadziło to do wytworzenia wytrzymałych powłok PEDOT/Tc i PEDOP/Tc o wysokiej zdolności magazynowania ładunku i wydajności uwalniania leku, oraz niskiej rezystancja przenoszenia ładunku, które zdolne są do dostarczenia stabilnego sygnału elektrycznego. Badania morfologii i hydrofilowości otrzymanych warstw polimerowych wykazały, że powierzchnie matryc PEDOP charakteryzują się znacznie większą chropowatością w porównaniu z powierzchnią warstw PEDOT oraz, że wszystkie powierzchnie są hydrofilowe co sugeruję, że chociaż nie będą one stanowiły bariery dla użytych w badaniach modelowych bakterii *E. coli* to jednak większa chropowatość matryc PEDOP powinna wpływać na lepsze zasiedlanie powierzchni zarówno przez bakterie ale i, co jest szczególnie ważne, na lepszą adhezję komórek nerwowych w porównaniu do matryc PEDOT. Badania uwalniania tetracykliny wykazały, że warstwa PEDOP/Tc umożliwia uwolnienie większych ilości antybiotyku zarówno podczas uwalniania spontanicznego jak i wymuszonego.

Następnie Doktorantka przeprowadziła badania mające na celu ocenę właściwości antybakteryjnych wytworzonych powłok organicznych w odniesieniu do napylonej warstwy platyny. Uzyskane wyniki badań wskazują na skuteczność antybakteryjną obu matryc PEDOT, a także matrycy PEDOP/Tc. Natomiast w przypadku matrycy PEDOP stwierdzono, iż matryca posiada działanie silnie promujące adhezję i proliferację komórek bakteryjnych. Autorka wykazała, że chociaż obie matryce z immobilizowanym lekiem mają działanie antybakteryjne to w przypadku PEDOP/Tc jest ono znacznie

skuteczniejsze i właśnie ta matryca została wybrana do dalszych badań komórkowych z wykorzystaniem szczurzej linii komórkowej nerwiaka niedojrzałego B35 (praca A4). Jako próbki odniesienia użyto zarówno matrycę PEDOP jak i napyloną platynę. Za pomocą testu MTT, analizy cyklu komórkowego i testu apoptozy Autorka wykazała ochronny wpływ powłoki PEDOP/Tc na komórki nerwowe. Co więcej, PEDOP/Tc okazał się prowadzić do wzrostu liczby neurytów na komórkę, jak również długości neurytów w porównaniu z komórkami hodowanymi na platynie jak i warstwie PEDOP bez antybiotyku, co wskazuje, że PEDOP/Tc, ze względu na swoje zaawansowane właściwości elektrochemiczne oraz skuteczne działanie przeciwbakteryjne, jest odpowiednim materiałem do zastosowań jako powłoka interfejsów neuronowych. W związku z interesującymi wynikami przeprowadzonych badań, elementy o ewentualnym znaczeniu aplikacyjnym stanowią przedmiot zgłoszenia patentowego będącego częścią niniejszej rozprawy (praca A6).

Podsumowując ten etap należy zwrócić uwagę, że Autorka poznała i z powodzeniem stosowała nowoczesne techniki badawcze niezbędne w tego typu badaniach jak woltoamperometria cykliczna, elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, chronopotencjometria, spektroskopia w podczerwieni i mikroskopia sił atomowych, oraz kluczową w jej badaniach skaningową mikroskopię elektronową stosowaną w analizie morfometrycznej bakterii i komórek nerwowych. Dlatego też celem ostatniej publikacji w cyklu, (praca A5) zrealizowanym zresztą z dużym powodzeniem, było przedstawienie zestawu wytycznych dotyczących wykorzystania SEM do analizy morfologii komórek prokariotycznych i eukariotycznych na przykładzie bakterii *E. coli* i komórek linii B35. Autorka opracowała zoptymalizowany protokół, który pozwala na obserwację szczegółów ultrastruktury komórek. Podkreślając wszechstronność deskryptorów morfometrycznych, Doktorantka przedstawiła szeroki zakres informacji, które można zebrać za pomocą obrazowania SEM materiałów biologicznych.

W części ***Podsumowanie*** Autorka zreasumowała uzyskane wyniki wykazując, że **cel planowanych badań** tj. …"*opracowanie innowacyjnych materiałów dla zastosowań biomedycznych, opartych na wybranych polimerach przewodzących będących nośnikami antybiotyku umożliwiającymi jednoczesną kontrolę nad procesem powstawania biofilmu bakteryjnego oraz stymulację komórek nerwowych a także zapewnić działanie neuroprotekcyjne*." **został bezsprzecznie osiągnięty**.

Uwagi do dysertacji: Praca przygotowana jest poprawnie i nie mam istotnych uwag merytorycznych, chociaż jak we wszystkich tego typu pracach istnieje pewna ilość drobnych błędów edycyjnych, o których nie warto wspomnieć. Jednakże jest kilka drobnych spraw, na które chciałem zwrócić uwagę bądź uzyskać odpowiedź, a mianowicie:

- W ostatnich dwóch zdaniach p. 5.3 na s. 36 Doktorantka formułuje wniosek dotyczący uwalniania antybiotyku z matryc PEDOT/Tc i PEDOP/Tc. Proszę o krótkie omówienie tego problemu.

- Na s.11 autorka podaje, że badania biokompatybilności wyrobu medycznego zgodnie z normami ISO obejmują między innymi …"badania wpływu wyrobu na tkanki, badania cytotoksyczności *in vitro*, ocenę miejscowej reakcji po implantacji czy ocenę biozgodności." Proszę o wyjaśnienie ewentualnej różnicy pomiędzy „biokompatybilnością" a „biozgodnością".

- Szkoda, że nie dołączono suplementów do publikacji cyklu (przynajmniej tych, które można

przedstawić w wersji drukowanej).

- W mojej opinii, streszczenia powinny jednak być włączone do rozprawy a nie tylko dołączone na osobnych kartkach, ale to już chyba zależy od wytycznych Rady Doskonałości konkretnej uczelni.

- Trochę niepotrzebnie dodano do komentarza część eksperymentalną. Wydaje się to zbyteczne, bowiem informacje w niej zawarte łatwo można znaleźć w załączonych publikacjach.

- Zwykle doktoranci dołączają w załącznikach do rozprawy w ocenianej formie oświadczenia współautorów publikacji dotyczące ich indywidualnego wkładu potwierdzające wkład Doktoranta.

- Proszę o informację/wyjaśnienie jaka jest właściwa nazwa linii komórkowej B35 – linia k. nerwiaka zarodkowego (s.15) czy niedojrzałego (s. 37). A może to jest to samo?

- S. 33, w ostatnim zdaniu Autorka pisze o immobilizacji biocząsteczek w PEDOP i PEDOT. Czy ibuprofen i deksametazon to biocząsteczki?

- Autorka z uporem w cytowaniu publikacji A4 podaje rok ukazania się pracy jako 2021 chociaż kopia pdf pokazuje, że jest to rok 2022.

Reasumując, uważam, że przedstawiona do recenzji **praca zawiera bardzo cenny materiał doświadczalny dotyczący zarówno syntezy przewodzących polimerów; poli(3,4-etylenodioksytiofenu) i poli(3,4-etylenodioksypirolu) zawierających immobilizowany antybiotyk oraz badań związanych z możliwością ich wykorzystania w zastosowaniach biomedycznych, wnosząc istotny wkład w rozwój nauk chemicznych**. Wyniki badań prezentowane w recenzowanej dysertacji zostały już zweryfikowane przez środowisko naukowe, gdyż są one przedmiotem pięciu publikacji w renomowanych czasopismach naukowych notowanych w bazie JCR oraz, co warto podkreślić, jednego krajowego zgłoszenia patentowego. Były one również przedmiotem 16 wystąpień na konferencjach krajowych i zagranicznych. Lektura dorobku naukowego Doktorantki wykazuje dodatkowe 3 publikacje w czasopismach z IF, a sumaryczny IF wszystkich publikacji wynosi 42,464 co w przypadku młodego naukowca jest bardzo dobrym osiągnięciem. Ponadto Doktorantka brała udział w realizacji ośmiu projektów badawczych, w tym dwóch finansowanych przez NCN. Warto zwrócić uwagę, że Pani mgr inż. Czerwińska-Główka odbyła 3,5-miesięczny staż naukowy w National University of Ireland. Kandydatka była wielokrotnie laureatką grantów rektorskich za publikacje wydane w czasopismach TOP1 i TOP10. **Doktorantka wykazała się znaczną wiedzą w dziedzinie chemii, ze szczególnym uwzględnieniem elektrochemii i chemii polimerów. Poznała i z sukcesem stosowała nowoczesne techniki badawcze niezbędne w realizacji zaplanowanych badań.**

Na podstawie szczegółowej analizy przedłożonej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki **stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami i zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie**

mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki do dalszych części przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy badań *przedstawionych w powyższej rozprawie, udokumentowanych publikacjami, w których Doktorantka jest pierwszą autorką, co świadczy o Jej dominującym wkładzie w powstanie tych publikacji,* ***wnioskuję o jej wyróżnienie.***

Podpisane odręcznie przez autora

Piotr Kurcok

Gliwice, 10 sierpnia 2022r.