UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Chemii

Warszawa, 5 września 2022

dr hab. Maciej Mazur, prof. ucz.
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki pod tytułem "Elektroaktywne powierzchnie polimerowe do sterowania wzrostem biofilmu bakteryjnego i komórkowego"

Praca doktorska Pani mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki pod tytułem "Elektroaktywne powierzchnie polimerowe do sterowania wzrostem biofilmu bakteryjnego i komórkowego " została zrealizowana w Katedrze Fizykochemii i Technologii Polimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyny Krukiewicz, prof. ucz.

Rozprawa dotyczy otrzymywania przewodzących warstw polimerowych i badania ich wpływu na osadzone na nich komórki bakteryjne i/lub nerwowe. W założeniu polimery te miałyby umożliwiać kontrolowanie żywotności bakterii i komórek, tak aby ich warstwy mogły być wykorzystane do pokrywania implantów neurologicznych. W szczególności powłoki miałyby mieć właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a jednocześnie dobrze integrować się z tkanką nerwową. Ze względu na elektroaktywność i możliwość inkorporacji molekuł, warstwy mogłyby umożliwiać dozowanie leków (antybiotyków) poprzez ich spontaniczne lub stymulowane elektrycznie uwalnianie. Tym samym, ze względu na duży potencjał aplikacyjny, tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Czerwińskiej-Główki jest aktualna, ważna i dobrze wpisuje się w rozwijane obecnie trendy badawcze.

Praca doktorska składa się z pięciu publikacji naukowych poprzedzonych 30-stronicowym komentarzem, który ma na celu systematyzować treści zawarte w publikacjach.

W owym komentarzu zawarto cel pracy, procedury eksperymentalne, jak również przedstawiono najważniejsze wyniki z ich dyskusją oraz wnioski i bibliografię. Autorka zamieszcza również spis swoich najważniejszych osiągnięć naukowych.

Swój komentarz do cyklu publikacji Doktorantka rozpoczyna 5-stronicowym wstępem. Przedstawia w nim tło badań, zwracając uwagę na znaczenie problemów leczenia chorób układu nerwowego, w tym chorób neurodegeneracyjnych. Przedstawia w tym celu szereg danych statystycznych dotyczących liczebności chorych, jak również częstotliwości powikłań wywoływanych infekcjami bakteryjnymi po zastosowaniu implantów medycznych. Mgr inż. Czerwińska-Główka omawia też materiały stosowane współcześnie do konstrukcji implantów dyskutując ich zalety i wady. Szczególną uwagę zwraca na polimery przewodzące, które w ostatnich latach zostały zaproponowane do wykorzystania jako powłoki neuroimplantów. Następnie Doktorantka przedstawia cel pracy. Został on sformułowany jasno i precyzyjnie; wskazane zostały wszystkie najważniejsze zadania jakie postawiła przed sobą Doktorantka.

W dalszej części mgr inż. Czerwińska-Główka przedstawia opis procedur eksperymentalnych. Jest to w zasadzie powielenie informacji zawartych w publikacjach naukowych, tym samym zapewne mógłby zostać pominięty. W jakimś sensie powtarza informacje z publikacji również rozdział „Wyniki". Zapewne w zamierzeniu miał on w syntetyczny sposób przestawiać najważniejsze dane eksperymentalne, niestety jest on bardzo mało czytelny. Znajdują się w nim rysunki i tabele bez żadnego komentarza (choć z podpisami), które wywołują u osoby czytającej raczej konfuzję. Dezorientacja nieco mija, gdy czytelnik dochodzi do rozdziału „Dyskusja", gdzie Autorka w dość syntetyczny sposób streszcza 5 publikacji, które stanowią podstawę pracy doktorskiej. W ocenie recenzenta zamieszczenie danych doświadczalnych bezpośrednio w rozdziale z dyskusją byłoby znacznie klarowniejsze i ułatwiałoby lekturę tekstu. Sam tekst „Dyskusji" nie budzi większych zastrzeżeń, natomiast uwagi merytoryczne recenzent pozwoli sobie zgłosić przy omawianiu poszczególnych publikacji. Co najwyżej można w tym miejscu zwrócić uwagę na niezręczności językowe takie jak np. „otrzymałam krzywe CV o różnej powierzchni" (str. 33), czy wzbudzające trwogę związki frazeologiczne, takie jak „dekskryptory morfometryczne"

(str. 39). Autorka powinna też pamiętać, że w naukach doświadczalnych nie weryfikuje się hipotez naukowych (str. 37), a jedynie potwierdza je lub falsyfikuje w testach eksperymentalnych.

Pierwsza publikacja (A1) jest przeglądem literaturowym omawiającym wybrane zagadnienia dotyczące efektów elektrycznych w organizmach żywych, w szczególności w bakteriach. Przegląd rozpoczyna krótki rys historyczny, w którym wskazano na przełomowe prace Galvaniego sprzed ponad dwustu lat w tej dziedzinie. Autorka dyskutuje efekty elektryczne w organizmach żywych, wymieniając w tym aspekcie królestwa zwierząt, roślin i bakterii. Czy istnieją jakieś doniesienia literaturowe odnośnie organizmów dwóch pozostałych królestw: grzybów i protistów? Czy jakiekolwiek efekty obserwuje się u wirusów? Ta część przeglądu literaturowego jest wyczerpująco i poprawnie napisana. Na pewno jednak podpis do Schematu 1 nie jest poprawny.

Kolejny rozdział dotyczy omówienia metod elektrochemicznej analizy biofilmów bakteryjnych. Doktorantka przytacza tu np. pomiar potencjału czynnościowego biofilmu, podając szereg szczegółów eksperymentu opisanego w cytowanej publikacji, ale niestety nie przedstawia zasady takiego pomiaru. Podając przykłady wykorzystania woltamperometrii cyklicznej, woltamperometrii pulsowej różnicowej i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, nie wspomina o skaningowym mikroskopie elektrochemicznym, który jest dość często stosowany w badaniach biofilmów bakteryjnych, a jest niewątpliwie metodą elektrochemiczną. Pewien chaos wkradł się do Tabeli 1 (publikacja A1), gdzie podawanych jest mnóstwo często mało istotnych parametrów, i to w sposób niekonsekwentny (np. w przypadku woltamperometrii cyklicznej „sampling interval" podany jest w odniesieniu tylko do publikacji oznaczonej numerem [42], podobnie jak „equillibrium time" tylko w przypadku publikacji [35]).

W rozdziale 4 (publikacja A1) mgr inż. Czerwińska-Główka omawia procesy elektrycznej stymulacji komórek bakteryjnych, choć biorąc pod uwagę przytaczane przykłady chodzi raczej o inhibicję, a nie stymulację.[1] Wymienione są przykłady inhibicji bezpośredniej,

[1] Zgodnie ze Słownikiem Języka Polskiego PWN, jedno ze znaczeń terminu stymulacja to „pobudzające działanie bodźców zewnętrznych na organizm żywy". Podobnie w języku angielskim „stimulation" to „an action

gdzie w wyniku przepływu prądu następuje śmierć komórki poprzez uszkodzenie błony bakteryjnej lub blokowane jest namnażanie komórek bakteryjnych. Inhibicja pośrednia obejmuje takie procesy jak wywołana przepływem prądu zmiana pH, czy generowanie toksycznych produktów reakcji elektrochemicznych (H_2O_2).

Rozdział 5 zatytułowany „Specific applications of electro-bacteriology" podzielony jest na dwa podrozdziały. W pierwszym (5.1) omawiane są zagadnienia wywoływanego elektrycznie działania przeciwdrobnoustrojowego. Można się zastanawiać, czym właściwie różni się ten podrozdział od rozdziału 4, gdzie omawiana była inhibicja wzrostu bakterii. Z drugiej strony w podrozdziale 5.1 Autorka pisze o wpływie pola elektrycznego na ruch komórek bakteryjnych. Czy nie nadaje się to lepiej do rozdziału 4, który zgodnie z tytułem miał dotyczyć elektrycznej stymulacji komórek bakteryjnych.

Niezależnie od tego, które treści powinny znaleźć się w którym rozdziale, zwraca uwagę kilka nieścisłości i niekonsekwencji. Str. 6 (publikacja A1): „Since the bacterial membrane is charged, the presence of opposed charge on the surface of biomaterial can lead to the situation when bio- material and bacteria repel one another." Ładunki różnoimienne chyba powinny się przyciągać? Str. 7 (publikacja A1). Co to jest „field intensity of current"? Natężenie pola prądu?

Drugi podrozdział rozdziału piątego (5.2) zatytułowany jest „Bacteria-based electro-technologies". Mgr inż. Czerwińska-Główka omawia w nim procesy oczyszczania ścieków i gleby z wykorzystaniem bakterii, przy współudziale zjawisk takich jak elektrokoagulacja, elektroforeza i elektroosmoza. Ogólnie opis jest merytorycznie poprawny, ale i tu znaleźć można nieścisłości, np. napięcie wyrażone jest w jednostkach V/cm (strona 9, publikacja A1).

Rozdział 6 dotyczy mikrobiologicznych ogniw paliwowych. Doktorantka omawia zasadę działania takich ogniw, ich zalety, ale również wady, które powodują względnie ograniczone ich użycie w praktyce. Porównując efektywność ogniw opisywanych w cytowanych publikacjach mgr inż. Czerwińska-Główka zamiennie stosuje pojęcia mocy i gęstości mocy, a przecież nie są to synonimy.

---

or thing that causes someone or something to become more active or enthusiastic, or to develop or operate (Cambridge Dictionary).

Artykuł A1 kończy rozdział „Wnioski i perspektywy". Wnioski podsumowujące są napisane klarownie i przekonująco, perspektyw jednak jakby nieco zabrakło.

Druga publikacja (A2) składająca się na rozprawę doktorską dotyczy badań hodowli bakterii *Escherichia coli* na cienkich warstwach platyny osadzonej na powierzchni szkła. Celem pracy było sprawdzenie czy podłoże platynowe będzie wykazywać właściwości przeciwdrobnoustrojowe, co można było domniemywać na podstawie dotychczasowych doniesień literaturowych. W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka ustaliła, że wpływ warstw platyny na bakterie nie jest jednoznaczny, ale raczej promuje ona rozwój drobnoustrojów, niż przeciwdziała mu.

Wstęp do artykułu jest poprawnie napisany i nie budzi zastrzeżeń. Można mieć co najwyżej wątpliwości czy używanie terminu „logarithmic phase" dla określenia fazy rozwoju hodowli komórek bakteryjnych, w którym następuje eksponencjalny wzrost liczby bakterii jest uzasadnione. Oczywiście w literaturze termin „logarithmic phase" jest powszechnie używany, ale niektórzy autorzy wolą określenie „exponential phase". Może warto wspierać dobre praktyki w nauce i wykorzystywać nazwy adekwatne do rzeczywistości?

Rozdział „Materiały i metody" wyczerpująco podaje stosowane odczynniki, materiały i aparaturę. Opis procedur doświadczalnych jest przejrzysty i kompletny. Recenzent ma jedynie drobną wątpliwość, na jakiej podstawie formułowany jest wniosek, że sterylizacja roztworem etanolu przez 1 godzinę nie wpływa na właściwości powierzchniowe badanych materiałów (platyny, szkła) (str. 3, publikacja A2)? Czy było to sprawdzane eksperymentalnie?

Rozdział „Wyniki i dyskusja" rozpoczyna charakterystyka stosowanych podłóż, warstwy platyny na szkle oraz samego szkła. Autorka stosuje m.in. skaningową mikroskopię elektronową do określenia chropowatości powierzchni wyrażanej jako parametr S_a. Czy przy wykorzystywanych niewielkich powiększeniach z mikroskopu uzyskany wynik jest wiarygodny? Na zdjęciu SEM nie widać zbyt wielu szczegółów (co akurat specjalnie nie dziwi). Czy analiza obrazu SEM przy większym powiększeniu daje zbliżoną wartość parametru S_a? Jak szacowany był błąd pomiaru?

Kolejną stosowaną metodą był pomiar kąta zwilżania, z którego wynika, że powierzchnia platyny jest bardziej hydrofilowa niż powierzchnia szkła. W oparciu o dane literaturowe Doktorantka dochodzi do wniosku, że mniejsza chropowatość powierzchni platyny powinna utrudniać kolonizację przez bakterie (w porównaniu do szkła), natomiast należałoby oczekiwać efektu odwrotnego jeśli chodzi o hydrofilowość (w przypadku *E. coli*). Rozumowanie wydaje się rozsądne, choć jak można sądzić na efektywność rozwoju bakterii może też wpływać skład chemiczny podłoża. Przeprowadzone w dalszej części artykułu badania biologiczne pokazują, że liczby komórek osadzonych na powierzchni platyny i szkła są porównywalne. W tym miejscu warto jednak zauważyć, że pomiary liczby komórek bakteryjnych na powierzchni platyny były dokonywane ponownie w tych samych warunkach na potrzeby publikacji A3 oraz A4. Przykładowo dla czasu hodowli 3 h, liczba bakterii na powierzchni platyny (na 200 μm^2) w publikacji A2 wynosi 12,9±2,1, w publikacji A3 – 27.9±3,8, a w publikacji A4 – 11,5±1,0 . Dla innych czasów hodowli rozrzut wyników jest podobny, a nawet większy, mimo że we wszystkich przypadkach podane błędy są relatywnie niewielkie. Które wyniki są wobec tego najbliższe rzeczywistości obiektywnej? To rodzi też pytania natury ogólniejszej. Czy inne wyznaczone eksperymentalnie wielkości też są obarczone tak dużymi błędami (mimo deklarowanych małych wartości błędów), a jeśli tak, to które? Czy wnioski wysnuwane na podstawie takich danych są wiarygodne?

Wracając do publikacji A2. W oparciu o wartości liczby komórek bakteryjnych przypadających na pole powierzchni Doktorantka wysnuwa wniosek, że w początkowym okresie (3 h) na platynie rozwija się mniej bakterii niż na szkle (choć zaznacza, że równice te nie są istotne statystycznie). Czy gdyby uwzględniła dane z publikacji A3, wniosek byłby odwrotny? Wyznaczona liczba komórek bakteryjnych zasiedlających podłoża byłaby zapewne jeszcze inna, gdyby uwzględnić dane z mikroskopu konfokalnego. Czy Doktorantka mogłaby podczas obrony pracy doktorskiej pokazać te dane? Z filmu wideo prezentującego wyniki z mikroskopu konfokalnego (Supplementrary material, A2) wynika, że szereg komórek bakteryjnych znajduje się w pewnej odległości od powierzchni, niektóre zorientowane są prostopadle do podłoża. Dodatkowo analiza LIVE/DEAD pokazuje, że znacząca liczba bakterii przytwierdzonych do powierzchni jest martwa. Może więc w

analizach należałoby uwzględniać jedynie bakterie żywe? Zamiast operować w dyskusji wartościami procentowymi podać wartości liczby żywych bakterii przypadających na jednostkę powierzchni?

Wyniki przedstawione w publikacji A2 pokazują, jak trudna jest praca z materiałem biologicznym i na jakie niespodzianki narażony/a jest badacz/ka. Niezależnie od uwag polemicznych recenzenta należy podkreślić, że publikacja jest bardzo wartościowa i stanowi dobry punktu wyjścia do badań przedstawionych w kolejnych dwóch pracach.

Praca A3, opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie *Materials Science and Engineering C*, dotyczy badań warstw PEDOT z inkorporowaną tetracykliną. W założeniu, warstwa PEDOT ma stanowić matrycę dla antybiotyku i uwalniać go spontanicznie albo pod wpływem potencjału elektrycznego, co ma zapobiegać wzrostowi bakterii. Dzięki takim właściwościom, a także dobrej integracji z tkankami, warstwy takie mogłyby stanowić pokrycia implantów medycznych.

Wstęp do artykułu jest rozbudowany, cytuje rozsądną liczbę trafnie dobranych pozycji literaturowych i dobrze wprowadza w tematykę badawczą. Część eksperymentalna (Experimental) też nie budzi większych zastrzeżeń, zapewniając wszystkie szczegóły niezbędne odtworzenia badań przez inne osoby. Pewne pytania rodzi sposób sterylizacji próbek. Inaczej niż w pracy A2, warstwy polimeru osadzone na powierzchni platyny/szkła sterylizowane są poprzez naświetlanie promieniowaniem UVC przez 1 h. Czy naświetlanie wysokoenergetycznym promieniowaniem nie wywołuje zmian degradacyjnych w polimerze i zainkorporowanym leku? Czy było to sprawdzane eksperymentalnie? Czy ewentualna degradacja może wpływać na późniejszą dyskusję wyników?

Rozdział „Wyniki i dyskusja" rozpoczyna omówienie wyników elektrochemicznego osadzania polimeru i inkorporacji tetracykliny. Polimer (w obecności lub bez tetracykliny) otrzymywany jest metodą woltamperometrii cyklicznej z wodnego roztworu monomeru. O ile otrzymywanie samego polimeru jest znane i nie budzi wątpliwości, można się zastanawiać jaki wpływ na polimeryzację EDOT ma dodatek tetracykliny. Jak wynika z danych literaturowych tetracyklina ulega reakcjom utleniania (np. Han i wsp, Electroanalysis 2022, 34, 735). Autorka pokazuje krzywą woltamperometryczną Tc, na której dobrze widoczne są

piki w zakresie potencjałów ujemnych (redukcja Tc), ale jak się wydaje nie jest widoczny sygnał utleniania? Dlaczego? Przy jakim potencjale zachodzi utlenianie tetracykliny w badanych przez Doktorantkę warunkach? Powyższe wątpliwości rodzą pytanie, czy w trakcie elektropolimeryzacji tetracyklina nie reaguje w jakimś stopniu w kationorodnikami EDOT (sama Autorka pisze o „deteriorating effect of Tc on the electrochemical polymerization of EDOT") ? W eksperymentach uwalniania Tc, rejestrowane widmo elektronowe jest podobne do wzorca, ale metoda UV VIS jest dość mało specyficzna.

Do określenia „jakości elektrochemicznej" Pani Czerwińska-Główka wykorzystuje wielkość, którą nazywa „charge storage capacity". Wielkość ta mówi zapewne coś o polimerze (czy można ją powiązać ze stopniem domieszkowania?), ale czy nie lepsze byłoby podanie jego przewodnictwa właściwego? Jaka jest zawartość zainkorporowanej Tc w przeliczeniu na masę polimeru? W jaki sposób mierzona była grubość warstw polimerowych (brak informacji w Experimental). Jaka jest grubość warstw bez inkorporowanej Tc?

Do potwierdzenia inkorporacji tetracykliny wykorzystywana jest spektroskopia w podczerwieni - obecność pasm charakterystycznych Tc ma potwierdzać jej obecność. Porównanie widma PEDOT/Tc z widmem samej Tc nie jest jednak jednoznaczne. Np. dublet w widmie Tc wokół 1600 cm^{-1} zamienia się w dość szerokie, pojedyncze pasmo w widmie PEDOT/Tc. Inne pasma Tc też są słabo widoczne w widmie PEDOT/Tc. Może świadczy to o degradacji tetracykliny podczas elektropolimeryzacji EDOT?

W dalszej części artykułu Pani Czerwińska-Główka przedstawia wyniki uwalniania Tc z warstw polimerowych. Pomiary przeprowadzane są poprzez pomiar absorbancji roztworu będącego w kontakcie z warstwą. Jak wykazano ilość uwalnianej spontanicznie tetracykliny zależy od początkowego stężenia w roztworze polimeryzacyjnym oraz liczby cykli woltamperometrycznych podczas elektropolimeryzacji, choć nie jest to prosta relacja. Tetracyklina może być również uwalniana poprzez zmianę potencjału elektrody. W celu uwolnienia Tc stosowano skok potencjałowy od -0,6 V do -0,5 V przez 600 s. Skąd taki wybór potencjałów? Doktorantka pisze, że zmniejszenie objętości polimeru pod wpływem potencjału powoduje uwalnianie Tc. Czy wtedy tetracyklina nie zostaje jeszcze silniej pułapkowana w polimerze? Jaki miałby być dokładny (nawet hipotetyczny) mechanizm

uwalniania? Ilość uwalnianej poprzez zmianę potencjału tetracykliny jest ok. 3 razy większa niż w przypadku uwalniania spontanicznego, ale kinetyka tych procesów jest jak się wydaje dość zbliżona.

Do badania właściwości przeciwdrobnoustrojowych warstw PEDOT (z i bez Tc) Autorka wykorzystuje, podobnie jak w publikacji A2, hodowle bakterii *E. coli*. Liczba komórek bakteryjnych przypadająca na jednostkę powierzchni jest wykorzystywana jako miara skuteczności przeciwbakteryjnej warstw. Pokrycie powierzchni platyny PEDOT zmniejsza liczebność komórek, a jeśli w warstwie zainkoroporowana jest tetracyklina, to efekt ten jest jeszcze silniejszy, co wydaje się w pełni zrozumiałe. Analizując jednak kinetykę spontanicznego uwalniania Tc warto sobie uświadomić, że większość Tc przechodzi do roztworu w ciągu pierwszych 15 min. Skoro tak, to podczas inkubowania próbek z bakteriami przez 3, 24 i 48 godzin, praktycznie przez cały czas Tc pozostaje w roztworze. Pojawia się więc pytanie o sensowność wykorzystania matrycy polimerowej do inkorporacji, a następnie uwalniania leku, skoro prawdopodobnie analogiczny efekt można uzyskać poprzez zwykłe dodanie tetracykliny do roztworu? Będzie taniej, prościej i zgodnie z zasadami zielonej chemii.

Nie ma jednak wątpliwości, że zaprezentowane w publikacji A3 wyniki są niezwykle interesujące. Szkoda, że Autorka w większym stopniu nie skupiła się na badaniach uwalniania poprzez zmianę potencjału elektrody. Recenzent zdaje sobie jednakże sprawę, że pomiary byłyby znacznie trudniejsze do przeprowadzenia, w szczególności pomiary biologiczne.

Kolejna publikacja (A4) w ramach rozprawy doktorskiej mgr inż. Czerwińskiej-Główki jest w pewnym sensie kontynuacją i rozwinięciem pracy A3. Zamiast PEDOT, Autorka stosuje mniej znany polimer PEDOP, dodatkowo oprócz hodowli bakteryjnych wykorzystuje hodowle komórek nerwowych, aby zbadać właściwości neuroprotekcyjne pokryć polimerowych (z lub bez tetracykliny).

Od strony merytorycznej publikacja nie rodzi zasadniczo innych nowych uwag niż te zgłoszone uprzednio w przypadku prac A2 i A3. Należy natomiast podkreślić wartościowe i użyteczne badania adhezji warstwy polimerowej do podłoża, pomiary AFM oraz analizę impedancyjną. Bardzo dobre wrażenie robią też badania biologiczne, w tym testy MTT na

linii komórkowej nerwiaka niedojrzałego B35, analiza cyklu komórkowego, określenie rodzaju śmierci komórkowej oraz analiza morfologii komórek nerwowych. Uzyskane wyniki badawcze okazały się na tyle nowe i innowacyjne, że stały się podstawą przygotowania krajowego zgłoszenia patentowego, co z dużym prawdopodobieństwem powinno prowadzić do uzyskania patentu.

Oczywiście można też puścić wodze fantazji. Na warstwie polimerowej z inkorporowaną tetracykliną hodowane są komórki nerwowe zainfekowane bakteriami *E. coli*. Pod wpływem impulsu elektrycznego antybiotyk jest uwalniany, powodując obumieranie bakterii oraz wspomagając rozwój neuronów. Następnie eksperyment przeprowadzany jest *in vivo* na zwierzętach, a zakończone sukcesem badania kliniczne na ludziach umożliwiają wprowadzenie wyrobu medycznego na rynek. W międzyczasie dr inż. Dominika Czerwińska-Główka zakłada spółkę akcyjną, której debiut na amerykańskiej giełdzie NASDAQ zapewnia inwestorom 1000-krotny zysk.

Ostatnia z cyklu publikacji (A5) ma ponownie charakter przeglądu literaturowego. Omawia ona metody przygotowania próbek oraz analizy zdjęć obiektów biologicznych wykonanych skaningowym mikroskopem elektronowym.

Na metody przygotowania próbek do SEM składają się procedury utrwalania, dehydratacji i pokrywania warstwami przewodzącymi. Są one dobrze omówione, a dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń. Autorka bliżej opisuje zoptymalizowaną przez siebie metodę preparacji opartą na utrwalaniu w 3% roztworze aldehydu glutarowego, a następnie dehydratacji w szeregu mieszanin wodno-etanolowych, o stopniowo zwiększanej zawartości alkoholu. Szkoda, że Autorka nie pokazała, jak wyglądałaby próbka pod mikroskopem elektronowym (np. komórki bakteryjne *E. coli*), gdyby pominąć procedurę preparatywną i ograniczyć się do nakroplenia zawiesiny bakterii, wysuszenia jej, a następnie napylenia cienką warstwą metalu? Czy „deskryptory morfometryczne" jakoś zasadniczo by się zmieniły?

Druga część artykułu A5 omawia metody analizy obrazów mikroskopowych w celu uzyskania skwantyfikowanych parametrów, które można odnieść do cech fizjologicznych i fizykochemicznych obiektów biologicznych. Szczególnie interesujące są rozdziały dotyczące

analizy fraktalnej i teksturalnej. Ta część artykułu jest bardzo dobrze opracowana, choć na stronie 6 (publikacja A5) pojawia się tajemnicza formuła matematyczna, w której objętość ma wymiar odległości. Pozostaje też problem wiarygodności wyznaczania liczby komórek przypadających na jednostkowe pole powierzchni, co było już sygnalizowane w recenzji wcześniej - artykuł taki jak ten byłby chyba dobrym miejscem do dyskusji tego typu kwestii. Nie zmienia to faktu, że publikacja, zgodnie z tytułem (*Guidelines for a Morphometric Analysis...*), jest wyśmienitym przewodnikiem po zagadnieniach preparatyki i analizy materiałów biologicznych z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej.

Wnioski końcowe

Po zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki stwierdzam, że cel rozprawy został jasno sformułowany, a zastosowana metodologia badawcza i materiały umożliwiły jego realizację z sukcesem. W publikacjach naukowych składających się na rozprawę doktorską mgr inż. Dominika Czerwińska-Główka ma dominujący indywidualny wkład. Układ pracy doktorskiej jest prawidłowy, a zastosowane piśmiennictwo nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i potwierdza szeroką wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa Pani Czerwińskiej-Główki włącza się w dynamicznie rozwijany na całym świecie nurt poszukiwań materiałów wielofunkcyjnych do zastosowań w medycynie. Interdyscyplinarne podejście, konieczność znajomości różnych dziedzin nauki, w tym technik eksperymentalnych, świadczy o wartości pracy, a w konsekwencji kompetencjach Doktorantki. Jestem pod ogromnym wrażeniem Jej pomysłowości, erudycji i dojrzałości naukowej. Oprócz wybitnego poziomu naukowego praca ma ogromny potencjał aplikacyjny, gdyż opracowywane warstwy polimerowe mogą znaleźć zastosowanie jako powłoki implantów neurologicznych.

Chciałbym bardzo wyraźnie zaznaczyć, że uwagi krytyczne zawarte w recenzji mają charakter wyłącznie polemiczny i w żadnym wypadku nie wypływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Uwagi i komentarze będą mam nadzieję okazją do pogłębionej dyskusji podczas publicznej obrony.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawowe i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Politechniki Śląskiej o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Czerwińskiej-Główki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, zaproponowane unikalne, nieoczywiste rozwiązania i znaczący wymiar aplikacyjny wnioskuję o jej wyróżnienie.

Podpisano odręcznie przez autora

ul. Ludwika Pasteura 1, 02-093 Warszawa
tel.: 22 55 26211 (Biuro Dziekana), 22 55 26230 (Administracja)
e-mail: dziekan@chem.uw.edu.pl, chemia@chem.uw.edu.pl, www.chem.uw.edu.pl