

## Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Svyatoslava Nastyshyna pt. „Smart polymer grafted brushes for biomedical applications”

### 1. Uwagi ogólne

Praca doktorska Pana mgra Svyatoslava Nastyshyna została zrealizowana na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego. Promotorami byli Pani dr hab. Joanna Raczkowska, prof. UJ oraz Pan prof. dr hab. Yuiriy Stetsyshyn. Tematyka dysertacji jest obszerna, zaprezentowane przez Doktoranta wyniki badań koncentrują się wokół powierzchni bioaktywnych, a w szczególności inteligentnych szczotek polimerowych do hodowli komórek oraz o właściwościach bakteriobójczych. Autor skoncentrował się na wytwarzaniu takich powierzchni, charakteryzacji ich właściwości fizycznych oraz badaniu ich oddziaływania z czynnikami biologicznymi, tj. komórkami zwierzęcymi i ludzkimi oraz bakteriami, badał także adsorpcję białek na takich powierzchniach.

### 2. Ocena merytoryczna pracy

#### 2.1. Znaczenie problematyki podjętej w rozprawie

Szczotki polimerowe to makrocząsteczki zakotwiczone na płaskiej powierzchni podłoża, takiego jak szkło lub krzem, bądź powierzchni nanocząstek. Zwykle charakteryzują się dużą powierzchnią gęstością makromolekuł, co wymusza pewien stopień ich organizacji. Ich właściwości fizyczne mogą ulegać zmianie w funkcji np. pH lub temperatury. W układach, w których występuje dolna krytyczna temperatura mieszalności (nie są one zbyt powszechne), polimer poniżej tej temperatury dobrze miesza się z rozpuszczalnikiem, w wyniku czego makrocząsteczka przyjmuje konformację kłębaka swobodnego. Z kolei w podwyższonej temperaturze mieszalność spada, rozpuszczalnik jest wypierany z makrocząsteczki, ta zaś zapada się. Daje to możliwość regulowania oddziaływań powierzchni z komórkami, białkami i bakteriami poprzez prostą zmianę temperatury eksperymentu. Przykładami polimerów wykazujących LCST są PNIPAM, pOEGMA i pVP. Dwa ostatnie były w niniejszej pracy intensywnie badane.

Potencjalne znaczenie inteligentnych szczotek polimerowych w badaniach biofizycznych jest ogromne. Powierzchnie ułatwiające adhezję i proliferację komórek ułatwiają hodowlę tychże komórek, a powinowactwo do określonych typów komórek daje nadzieję na łatwą ich separację. Z kolei możliwość zmiany parametrów powierzchni np. temperaturą otwiera perspektywę na kontrolowane uwalnianie komórek bądź też tkanek. Ponadto szczotki polimerowe mogą wykazywać właściwości bakteriostatyczne lub, wyposażone w dodatkowy czynnik antybakteryjny, bakteriobójcze. Jeśli dodać działanie temperatury lub innego czynnika wpływającego na konformację makrocząsteczek, takie powierzchnie mogą w kontrolowany sposób niszczyć bakterie, po czym samoczynnie oczyszczać się z

ich pozostałości. Interesujące możliwości aplikacyjne to m.in. antybakteryjne powierzchnie urządzeń medycznych czy też przedmiotów, mających częsty kontakt z florą bakteryjną poprzez dotyk. Jak wspomniano, szczotki polimerowe mogą być szczepione do nanocząstek, zaś same wykazują zróżnicowane powinowactwo do białek, uzależnione m.in. od stopnia hydrofobowości danego polimeru. Z tego względu można pomyśleć o dostarczaniu leków białkowych drogą podawania do krwioobrotu nanocząstek z zaadsorbowanym lekiem. Aby jednak było to możliwe, należy dokładnie poznać oddziaływania polimeru z białkiem, uwzględniając przede wszystkim kwestie termodynamiki adsorpcji protein.

Wymienione wyżej aspekty, które jednocześnie są treścią niniejszej dysertacji, mają ogromne znaczenie we współczesnych badaniach biomedycznych, zarówno jeśli chodzi o badania podstawowe, jak i aplikacyjne. Podsumowując, tematykę rozprawy należy uznać za aktualną, ważną i wartą zgłębiania.

## 2.2. Cel badawczy

Cel pracy sformułowano ogólnikowo w streszczeniu. Jest nim wytwarzanie nowatorskich szczotek polimerowych o ściśle określonych właściwościach, charakteryzacja ich właściwości fizykochemicznych i określenie ich oddziaływań z czynnikami biologicznymi.

## 2.3. Bibliografia

Bibliografia zamieszczona w dysertacji świadczy o dogłębnej analizie aktualnego stanu wiedzy, przeprowadzonej przez Doktoranta. Zawiera 137 pozycji, z czego ok. 1/3 to artykuły powstałe nie wcześniej niż w 2019 r., Autor odnosi się więc do najnowszych badań w swej dziedzinie. Dobór literatury oceniam jako poprawny, nie dostrzegłem żadnych istotnych braków w tym względzie. 17 pozycji to autocytywania. Nie jest to jednak zarzut – znaczna część wyników zaprezentowanych w niniejszym doktoracie została już bowiem rozpowszechniona w postaci publikacji w międzynarodowej prasie naukowej, a więc raczej brak tych pozycji w bibliografii należałoby uznać za niedociągnięcie.

## 2.4. Metody badań wykorzystane w pracy

W pracy wykorzystano szeroką gamę technik eksperymentalnych z trzech dyscyplin: fizyki, chemii i biologii. Szczotki polimerowe wytworzono dwiema metodami: polimeryzacji niekontrolowanej (powierzchnie płaskie i nanocząstki) oraz polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP, nanocząstki). Nanocząstki  $\text{CaCO}_3$  i srebra wytwarzano wewnątrz szczotek polimerowych metodami chemii mokrej poprzez wytrącanie i krystalizację z roztworów wodnych.

Skład chemiczny wytworzonych warstw badano metodą spektroskopii mas jonów wtórnych (TOF-SIMS), spektroskopii fotoemisji promieniowania X oraz spektroskopii promieniowania X z dyspersją energii (EDX). Topografię analizowano mikroskopem sił atomowych w trybie bezkontaktowym. Rozkład wielkości nanocząstek  $\text{SiO}_2$  wyznaczono za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, a morfologię pokryć zawierających cząstki węglanu wapnia badano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej. Metoda pomiaru kąta zwilżania umożliwiła wyznaczenie temperatury przejścia polimerów od stanu kłębaka swobodnego do zapadniętego (LCST) dla szczotek zaszczepionych na płaskich podłożach. Z kolei metoda ściśle optyczna – dynamiczne rozpraszanie światła – posłużyła Autorowi do określenia potencjału  $\zeta$  i promienia hydrodynamicznego nanocząstek krzemionkowych z zaadsorbowaną szczotką polimerową oraz wyznaczenia LCST. Termogravimetria pozwoliła wyznaczyć grubość polimerowej otoczki nanocząstek, a elipsometria – współczynnik załamania i grubość szczotek polimerowych i w efekcie również gęstość ich zaszczepienia na powierzchni.

Ludzkie i zwierzęce komórki hodowano na wcześniej przygotowanych podłożach polimerowych metodami ogólnie przyjętymi w badaniach biologicznych. Ich aktywność metaboliczną wyznaczano

mierząc stężenie tlenu w roztworze elektrodą Clarka. Barwienie komórek znacznikami fluorescencyjnymi połączone z analizą mikrofotografii umożliwiły ilościowe ujęcie adhezji i proliferacji komórek na podłożach, a także rozróżnienie komórek martwych od żywych.

Informacji natury termodynamicznej o powinowactwie białek do wybranych szczotek polimerowych i naturze oddziaływania z nimi dostarczyła izotermalna kalorymetria miareczkowa (ITC), bezpośrednio mierząca ciepło uwalniane w trakcie tworzenia lub zrywania wiązań chemicznych.

**Przyjętą metodologię badań uznaję za wszechstronną i prawidłową.** Wykorzystanie tak szerokiej gamy technik było konieczne z uwagi na interdyscyplinarny charakter badań, przekraczający granice trzech dyscyplin nauki, jednocześnie wymagało od Doktoranta dużego nakładu pracy w celu poznania odpowiednich technik badawczych i nauczenia się analizy wielu typów danych pomiarowych.

## 2.5. Opis poszczególnych części rozprawy

Praca składa się z 7 rozdziałów, jej układ jest logiczny i przejrzysty. Każdy z rozdziałów III-VII opisuje jeden temat badawczy i kończy się treściwym podsumowaniem, które w paru zdaniach zbiera najważniejsze wyniki uzyskane w danej części pracy. Napisana jest poprawnym i komunikatywnym językiem angielskim, Autor unika żargonu, prawie wszystkie pojęcia są należycie wyjaśnione. Pewne uwagi językowe i edycyjne są wymienione w sekcji 2.6.6. niniejszej recenzji,

Rozdział I ma charakter zwięzłego, ale wyczerpującego przeglądu literaturowego. Autor omawia aktualny stan wiedzy, dotyczący inteligentnych szczotek polimerowych i ich zastosowań w hodowli komórek i inżynierii tkankowej, jako warstw bakterioobójczych, oddziaływać białek z nanocząstkami, a także metod wytwarzania szczotek i inkorporacji w nich nanocząstek nieorganicznych.

Rozdział II omawia wymienione powyżej techniki eksperymentalne. Tekst świadczy o dobrej znajomości opisywanych zagadnień i o dużej samodzielności Autora w wykonywaniu badań.

Kolejna część pracy, rozdział III, dotyczy pierwszego tematu badawczego – szczotek polimerowych do hodowli komórek. Wykorzystano tutaj trzy rodzaje szczotek: pOEGMA, pVP oraz kopolimer p(OEGMA-co-VP). Widma TOF-SIMS w sposób przekonujący dowodzą wytworzenia pożądanego pokrycia polimerowego. Chropowatość szczotki kopolimerowej jest największa, co może sugerować, że na niej komórki będą narastać najchętniej. Doktorant studiuje wzrost zwierzęcych komórek warstwy ziarnistej i kompleksów komórki jajowej i komórek ziarnistych na poszczególnych podłożach i podłożu kontrolnym (czyste szkło). Wyniki sugerują, że zgodnie z przewidywaniami szczotka kopolimerowa daje najlepsze warunki dla wzrostu komórek.

Kolejny temat badawczy (rozdział IV) dotyczy wpływu nanocząstek węglanu wapnia obecnych w szczotce pOEGMA na żywe komórki. Autor, wykorzystując kombinację wielu metod fizycznych (elipsometria, AFM, SEM, TOF-SIMS, XPS, pomiar kąta zwilżania) udowadnia, że skutecznie udało mu się wytworzyć nanocząstki wewnątrz szczotki polimerowej. Dodatek składnika nieorganicznego skutkuje zwiększeniem hydrofilności pokrytych powierzchni. Co bardzo istotne, implementacja fazy nieorganicznej nie niszczy odpowiedzi temperaturowej układu, która jest wyraźnie widoczna w zmianie kąta zwilżania w funkcji temperatury. Jeśli chodzi o studia biologiczne, badano tutaj rozrost na podłożu z oraz bez fazy nieorganicznej ludzkich komórek trzech typów: zdrowych komórek skóry, komórek czerniaka oraz osteoblastów. Pomiar mikroskopii fluorescencyjnej pozwolił wyznaczyć liczbę komórek na podłożu w funkcji czasu hodowli, ich przeżywalność oraz współczynnik proliferacji. Choć badania przeprowadzono bardzo metodycznie, wyniki nie są do końca konkluzywne. CaCO<sub>3</sub> prawdopodobnie nie wykazuje cytotoksyczności w stosunku do żadnego z rodzajów badanych komórek. Nie udało się stwierdzić, aby komórki rakowe na podłożu polimerowym narastały z inną szybkością niż komórki zdrowe.

Jedne z ciekawszych wyników dysertacji zostały opisane w rozdziałach V i VI, traktujących o kontrolowanej temperaturą bakteriobójczości pokryw polimerowych z nanocząstkami srebra i ich wpływie na komórki ludzkie. W rozdziale V Doktorant opisuje syntezę szczotek pOEGMA oraz pVP, a następnie wytworzenie w nich nanocząstek srebra metodą wytrącania z roztworu. Fakt obecności nanocząstek został bezsprzecznie potwierdzony aż trzema metodami: TOF-SIMS, XPS i EDX. Pokrycia są jednorodne, czego dowodzą skany SEM i mapy SIMS, natomiast pojedyncze nanocząstki są widoczne pod AFM-em. Szczotki nie tracą swej aktywności temperaturowej pod warunkiem, iż zawartość srebra nie jest w nich zbyt duża. Udowodniono, że pokrycia są zabójcze dla bakterii E. coli oraz gronkowca złocistego w temperaturze 37°C, a więc powyżej LCST, natomiast nie wykazują takiej aktywności w niskich temperaturach. Ten wynik uważam za jeden z istotniejszych w pracy z punktu widzenia potencjalnych zastosowań.

Kolejny (VI) rozdział pracy to szczegółowa analiza fizyczna szczotek o różnej grubości z różną zawartością Ag. Tutaj wyznaczono optymalne warunki do wytworzenia termoresponsywnej szczotki polimerowej. Stwierdzono również, że ucieczka srebra z warstwy polimerowej nie jest procesem szybkim, skala czasowa to kilkadziesiąt dni. Ma to duże znaczenie dla biogodności i ewentualnych zastosowań badanych materiałów w kontakcie z organizmem ludzkim. W dalszej części Autor ustalił, że srebro zawarte w pokryciu nie jest toksyczne dla zdrowych komórek ludzkich, nie można natomiast wykluczyć pewnej toksyczności dla komórek rakowych (czerniak).

Ostatnia część dysertacji, rozdział VII, poświęcona jest analizie termodynamiki oddziaływania wybranych białek ludzkich ze szczotkami zaszczipionymi na nanocząstkach krzemionkowych. Wiedza dotycząca tych oddziaływań ma potencjalnie ogromne znaczenie, może przyczynić się choćby do opracowania efektywnych sposobów dostarczania cząsteczek leków, które często są właśnie białkami, do organizmu pacjenta. Badania dotyczą tym razem szerokiej klasy szczotek, zbudowanych z pOEGMA, pVP lub kopolimeru o różnej zawartości bloków VP. Dokładny skład i budowę warstw określono metodą XPS i termogravimetrią. Z kolei dane termodynamiczne (zmiana entalpii, entalpii swobodnej i entropii na skutek adsorpcji białka na powierzchni szczotki) wyznaczono metodą ITC. Badano trzy rodzaje białek: albuminę osocza ludzkiego, IgG oraz fibrynogen, a także ich mieszaninę. Wyniki wskazują, że obecność bloków VP w szczotce ułatwia adsorpcję wszystkich trzech białek niezależnie od temperatury. Z kolei w przypadku szczotek kopolimerowych istnieje możliwość przełączania powinowactwa białek do powierzchni temperaturą. Wynikiem tej części pracy jest bardzo duża ilość danych pomiarowych. Należy docenić, że ich analiza i wyekstrahowanie wspomnianych wyżej zależności nie było łatwe, tym bardziej, że w badanym układzie nie obserwuje się spektakularnych efektów, jeśli chodzi o różnice w adsorpcji białek.

Praca kończy się zwięzłym podsumowaniem, jest również zaopatrzona w spis wykorzystanych skrótów.

## 2.6. Uwagi krytyczne, polemiczne i pytania

### 2.6.1. Do rozdziału III

- Dobór jonów wtórnych świadczących o obecności poszczególnych polimerów wynika zapewne z analizy PCA, jednak brak o tym informacji w treści pracy – proszę o komentarz.
- Czy w pomiarach elipsometrycznych wykonywanych w stanie mokrym nie powstaje warstwa wody na powierzchni próbki, która dawałaby pewne artefakty pomiarowe?
- W Tab. 2 brakuje niepewności pomiarowych, przez co nie wiadomo czy różnice we współczynniku załamania i grubościach warstw w stanie „suchym” i „mokrym”, a także pomiędzy polimerami są znaczące statystycznie.

- Podobny problem pojawia się w Tab. 4: dane dotyczące zużycia tlenu w obecności inhibitorów nie są zaopatrzone w niepewności pomiarowe. Zapewne wynika to z charakteru pomiarów, tym niemniej proszę o komentarz.
- Z czego wynika brak danych ilościowych dla wzrostu kompleksów oocytów na podłożach polimerowych i szkle? Mikrofotografie wykonano (rys. 27), dlaczego więc brak danych liczbowych?
- Główny wniosek Autora z tej części badań, iż szczotka p(OEGMA-co-PVP) jest obiecującym podłożem do hodowli komórek zwierzęcych wydaje się nieco na wyrost. Różnice w ilości komórek warstwy ziarnistej na szkle i podłożu polimerowym dla obu czasów hodowli mieszczą się w zakresie niepewności pomiarowej. Ponadto metabolizm komórek w normalnych warunkach na podłożu kopolimerowym jest jednak słabszy niż na szkle, a lepszy jedynie w obecności inhibitora glikolizy.

#### 2.6.2. Do rozdziału IV

- Jaka była logika wyboru pokrycia pOEGMA do badań w tej części? Wyniki przedstawione w rozdziale III sugerowały, że komórki zwierzęce najlepiej narastają na podłożu kopolimerowym p(OEGMA-co-VP). Czy nie lepiej byłoby przeprowadzić badania właśnie na tym pokryciu?
- Omawiając zwilżalność materiału Autor pisze, że „The pOEGMA brush with embedded CaCO<sub>3</sub> nanoparticles is more hydrophilic than the native pOEGMA coating.”, co zresztą jasno widać z Fig. 32. Czy wynika to z podwyższonej chropowatości tej powierzchni (przykładowo powierzchnie superhydrofobowe można uzyskać odpowiednio dobierając geometrię podłoża)? A może z jakiegoś specyficznego oddziaływania z węglanem wapnia?
- W rozdziale II wspomniano, iż do wyznaczenia współczynnika załamania i grubości warstwy z danych elipsometrycznych użyto modelu Cauchy'ego. Czy takie modelowanie zawsze daje jednoznaczny wynik?

#### 2.6.3. Do rozdziału V

- Skale mikrofotografii SEM i map SIMS są znacząco różne, co utrudnia porównanie obu wyników
- Str. 53: „The imaging of <sup>107</sup>Ag<sup>+</sup> ions reveals sparse regions with higher intensity of ions (Fig. 40c), which may be related with Ag agglomerates, which were also observed in the SEM analysis (Fig. 40a).” – ta teza w moim mniemaniu jest dyskusyjna. Skala niejednorodności obserwowanych w obrazie SEM jest zupełnie inna (ułamki mikrometra) niż na mapach SIMS (przynajmniej kilka mikrometrów)

#### 2.6.4. Do rozdziału VI

- Na str. 68 Autor pisze: „The release of silver in an aqueous medium is a durable process, in which **only silver ions are released from the brush.**” O ile dobrze rozumiem Doktorant twierdzi, że z materiału uciekają jony srebra, a nie całe nanocząstki. Wydaje się, że nie można tego stwierdzić na podstawie samych pomiarów XPS

#### 2.6.5. Do rozdziału VII

- Zaobserwowane różnice w adsorpcji białek na podłożach przygotowanych w tej części pracy nie są spektakularne, co oczywiście nie jest zarzutem w stosunku do Doktoranta. Proszę o komentarz jakie modyfikacje pokryć polimerowych wchodziłyby w rachubę, aby te efekty były wyraźniejsze, tzn. aby przykładowo przygotować pokrycie polimerowe, które zdecydowanie wspomagałoby adsorpcję wybranego białka w jednym zakresie temperatur, a blokowałoby ją w innym przedziale.

## 2.6.6. Uwagi językowe i edycyjne

Pod względem edycyjnym praca jest przygotowana starannie, rysunki są właściwie opisane. Niektórzy czytelnicy mogą odczuć dyskomfort z powodu ogromu danych prezentowanych na poszczególnych rysunkach (np. rys. 48). Przystudiowanie tych grafik wymaga skupienia, jednak dane opisane są w taki sposób, że nie ma mowy o żadnej niejednoznaczności. Jedyne zarzut, który można postawić to zbyt niska rozdzielczość grafik, zarówno w wersji elektronicznej, jak i papierowej. We wspomnianych przypadkach, w których grafika prezentuje dużo wyników utrudnia to ich przystudiowanie.

Autor nie uniknął pewnych potknięć językowych i innych drobnych błędów redakcyjnych, jednak jest ich stosunkowo niewiele. Dla porządku wymienię kilka:

- Str. 17: After **that** ammonia...
- Str. 22: **Planck's** constant; correlating factor accounting **for** the work function; will not **be released from**; photoelectrons as a function of **their**...
- Str. 23: the distance between **the** tip and **the** surface
- Str. 23: were **measured** using ImageJ
- Str. 25: błąd we wzorze na funkcję lognormalną (brak  $\mu$ )
- Str. 26: zły (bardzo) rząd wielkości stałej Boltzmann; we wzorze na funkcję autokorelacji całka powinna przebiegać po  $dt$ , a nie  $dt$
- Str. 64: nanoparticles could **leave** the surface; are not capable of **leaving** the brush
- Str. 72: w nazwie potencjału  $\zeta$  użyto greckiej litery  $\xi$

Wymienione w tej sekcji uwagi mają w większości charakter polemiczny. Jednak nawet uwagi krytyczne nie umniejszają wartości ocenianej pracy.

## 3. Rozpowszechnienie wyników pracy w publikacjach naukowych

Wyniki badań zaprezentowane w rozprawie zostały opisane w 6 publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym, w trzech z nich Pan Nastyshyn jest pierwszym autorem. Wysoki współczynnik wpływu renomowanych czasopism (np. Appl. Surf. Sci. IF=7,392, Mat. Sci. Eng. C IF=7,328), w których badanie te się ukazały świadczy o ich znaczącym, światowym poziomie. Deklarowany wkład Doktoranta w powstanie tych publikacji jest znaczący. Doktorant jest także współautorem 3 innych publikacji o pokrewnej tematyce.

## 4. Wnioski końcowe

### 4.1. Przyjęcie rozprawy

Przedstawiona do oceny praca spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym **wniosuję o jej przyjęcie oraz o dopuszczenie Pana mgra Svyatoslava Nastyshyna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

### 4.2. Wyróżnienie rozprawy

Ponadto **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgra Svyatoslava Nastyshyna.**

### 4.3. Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy

Oceniana praca doktorska zawiera wartościowe, nowe wyniki o dużym znaczeniu poznawczym, a potencjalnie także aplikacyjnym. Doktorant wykazał się znajomością wielu technika wytwarzania materiałów, a także metod pomiarowych, działając na trudnym pograniczu trzech dyscyplin.

Dzięki uważnej analizie danych był w stanie wyciągnąć przekonujące wnioski z eksperymentów w obszarze badań, w którym powtarzalność wyników bywa problematyczna z uwagi na poziom komplikacji studiowanych systemów

Pan mgr Svatoslav Nastyshyn **posiada znaczący dorobek publikacyjny dotyczący tematyki rozprawy**. Obejmuje on sześć artykułów w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu, w trzech z nich mgr Nastyshyn jest pierwszym autorem, a w powstanie wszystkich miał znaczący wkład. Jest także współautorem 3 innych publikacji tematycznie powiązanych z tematem doktoratu.

Z wyżej wymienionych powodów wniosek o wyróżnienie rozprawy uważam za w pełni uzasadniony.



dr hab. inż. Jakub Haberko, prof. AGH