

dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. PWr
Katedra Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrocławska
50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27
tel. 71-370-4617
marta.kopaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 23.06.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Dynamics of nano objects suspended in liquids: experimental analysis

Autor rozprawy: mgr inż. Sylwia Pawłowska

Promotor: Prof. dr hab. Tomasz Kowalewski

Promotor pomocniczy: Dr Filippo Pierini

Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono na prośbę Z-cy Dyrektora Instytutu d.s. Naukowych prof. dr hab. Jacka Waniewskiego, wyrażoną w piśmie SRN/003/272018 z dnia 27 kwietnia 2018 roku, data wpływu pisma na Politechnikę Wrocławską: dnia 4 maja, 2018. Przewód doktorski jest prowadzony przez Radę Naukową Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Tematyka i charakter rozprawy doktorskiej

Dyfuzja biocząsteczek w przestrzeni międzykomórkowej oraz wymiana substancji pomiędzy komórką a otoczeniem jest niezwykle istotna dla jej prawidłowego funkcjonowania i zachowania homeostazy. Szczególnie trudnym procesem jest transportu leków do ośrodkowego układu nerwowego z uwagi na obecność bariery krew-mózg.

W świetle tych zagadnień ocena roli oddziaływań hydrodynamicznych na dynamikę i parametry transportu w mikro i nanoskali dla obiektów sferycznych i wydłużonych jest niezbędna do interpretacji zjawisk zachodzących w systemach transportujących leki, medycynie regeneracyjnej oraz w inżynierii tkankowej. Ważnym aspektem z punktu widzenia badań klinicznych jest również korelacja uwalniania biocząsteczek w warunkach *in vitro* i *in vivo* oraz opracowanie metod eksperymentalnych i konstrukcja aparatury badawczej symulującej warunki panujące w żywym organizmie. W obliczu tych zagadnień tematyka podjęta przez Doktorantkę jest nie tylko ważna, ale i

kluczowa dla zrozumienia dynamiki pojedynczych nanoobjektów oraz możliwości ich biomedycznego zastosowania.

Struktura oraz zawartość rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Sylwii Pawłowskiej liczy wraz z bibliografią 156 stron. Rozprawa jest napisana w języku angielskim, w postaci tradycyjnej monografii, obejmującej 6 rozdziałów, 92 rysunki, 15 tabel oraz 231 pozycje literaturowe. Praca zawiera również 6 załączników, stanowiących cenne uzupełnienie prezentowanych badań. Wstęp pracy zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz tezy pracy.

Rozdział 1 zawiera wprowadzenie do tematyki procesów transportu biocząsteczek w układach biologicznych oraz rolę dyfuzji w mikrosystemach. Opisano i scharakteryzowano sferyczne nanocząsteczki oraz nanowłókna hydrożelowe, stanowiące podstawę badań przedłożonej rozprawy. Przedstawiono dynamiczną charakterystykę mikro i nanoobjektów zawieszonych w płynach. Na końcu rozdziału umieszczono podrozdział „Dissertation overview”, w którym przedstawiono obszerne streszczenie rozprawy doktorskiej.

W rozdziale 2 Doktorantka zaprezentowała bogaty materiał badawczy: sferyczne obiekty polistyrenowe, nanocząsteczki złota oraz hydrożelowe nanowłókna. Przedstawiła metody preparatyki oraz szczegółowy opis aparatury wykorzystanej do eksperymentów badawczych oraz otrzymania elastycznych nanofilamentów.

W rozdziale 3 przedstawiono oddziaływania hydrodynamiczne i procesy transportu w mikro i nanoskali dla obiektów sferycznych. Doktorantka przeprowadziła analizę ruchów Browna sferycznych nanocząsteczek zawieszonych w elektrolitach. Wykazała wpływ siły jonowej zastosowanych roztworów soli jedno- i dwuwartościowych na wielkość średnicy hydrodynamicznej badanych obiektów. Wykazała istnienie rozbieżności średnicy hydrodynamicznej cząsteczki między danymi tabelarycznymi a eksperymentalnymi. Przeprowadzona analiza wyników wykazała, że średnica hydrodynamiczna nanocząsteczek sferycznych jest zależna od siły jonowej zastosowanego elektrolitu, a także, że w zakresie niskich stężeń soli jej wartość spada wraz ze wzrostem siły jonowej. Badania przeprowadzone nad mobilnością sferycznych nanocząsteczek pod wpływem fluktuacji termicznych wykazały, że istnieje wiele czynników wpływających na mobilność tych obiektów.

Rozdział 4 dotyczy analizy zachowania dynamicznego w przepływie wysoce odkształcalnych nanowłókien hydrożelowych, charakteryzujących się dużą elastycznością oraz specyficznymi właściwościami mechanicznymi, które mogą być stosowane jako modele biopolimerów i długich cząsteczek biologicznych, takich jak nici DNA, białka, włókna aktynowe. W tym celu

skonstruowano mikroprzepływowy układ eksperymentalny, który posłużył do analizy dynamiki deformacji oraz migracji nanofilamentów w przepływie oscylacyjnym.

W oparciu o przeprowadzane badania wykazano, że kierunek migracji nanowłókien zależy od przepływu, położenia w kanale i deformacji włókna. Analiza wyników pozwoliła na wydzielenie trzech grup badanych obiektów: „bent-like”, „U-shaped buckled”, „U-shaped stretched”, wykazujących różnice pod kątem właściwości zginania, orientacji w przepływie oscylacyjnym oraz kierunku migracji włókna.

Doktorantka przedstawiła metodę badań właściwości mechanicznych otrzymanych filamentów poprzez analizę ruchów Browna, ze szczególnym uwzględnieniem długości konturowej analizowanego obiektu, skorelowanej z modułem Younga. Wykazała, że otrzymane w warunkach eksperymentalnych hydrożelowe nanofilamenty charakteryzują się elastycznością zbliżoną do biopolimerów.

W rozdziale 5 zaprezentowano potencjalne zastosowanie obiektów sferycznych oraz wysoce elastycznych nanowłókien hydrożelowych w medycynie, inżynierii biomedycznej i materiałowej. Przedstawiono bardzo ciekawe wstępne badania zastosowania nanowłókien hydrożelowych jako systemu uwalniającego biocząsteczki.

Rozdział 6 zawiera podsumowanie z odniesieniem do tez rozprawy doktorskiej.

Ponadto, przedłożona rozprawa zawiera 6 załączników bardzo szczegółowo uzupełniających rozdziały pracy.

Bibliografia omawiana w rozprawie jest poprawnie dobrana, liczy 231 pozycji, w tym 6 współautorskich publikacji w czasopismach z Listy Filadelfijskiej. W tym miejscu chciałabym podkreślić bogaty dorobek Doktorantki, w tym publikacje w czasopismach o wysokim wskaźniku IF, jak *Macromolecules*.

Rozprawa jest bardzo starannie zredagowana i bogato ilustrowana, podział na rozdziały jest przemyślany i przejrzysty. Tezy zostały klarownie sformułowane.

Ocena oryginalności rozprawy doktorskiej

W pracy przeprowadzono analizę dynamiki ruchów nanoobiektów sferycznych oraz hydrożelowych nanowłókien w przepływach oraz ocenę roli dyfuzji molekularnej w nanosystemach. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę nad mobilnością sferycznych nanocząsteczek pod wpływem fluktuacji termicznych potwierdziły, że istnieje wiele czynników wpływających na hydrodynamiczną średnicę nanocząsteczek. Wiedza na temat precyzyjnej średnicy hydrodynamicznej nano i makrocząsteczek w układach biologicznych jest niezbędna do określenia dyfuzji molekularnej w środowisku wnętrza komórki, pozakomórkowo oraz w płynach ustrojowych.

Pozwala to na prawidłowe projektowanie układów nanocząsteczek w zastosowaniach biomedycznych.

Doktorantka opracowała oryginalną technikę otrzymywania wysoce elastycznych nanowłókien hydrożelowych jako modeli elastycznych biopolimerów, wykorzystując technikę elektroprzędzenia współosiowego, które mogą być wykorzystywane jako modele eksperymentalne do badań oddziaływań hydrodynamicznych odpowiedzialnych za procesy molekularne w strukturach biologicznych. Nowością jest zamknięcie w polimerowej otoczce hydrożelowego materiału w postaci filamentów, charakteryzującego się wysoką elastycznością oraz zastosowanie czynnika sieciującego tworzącego hydrożel, wpływającego na szybkość i skuteczność uwalniania biocząsteczki, co może zostać zastosowane w systemach zdolnych do selektywnego i kontrolowanego dostarczania leków, jako transportery substancji leczniczych oraz systemy do regeneracji tkanek w inżynierii tkankowej, kardiochirurgii oraz neurochirurgii.

Skonstruowano oryginalne urządzenie mikroprzepływowe do badań w przepływie oscylacyjnym nanoobjektów. Układ został wykorzystany do analizy dynamiki deformacji oraz zjawiska migracji nanofilamentów w przepływie oscylacyjnym, symulującym przepływy międzykomórkowe i międzytkankowe w żywych organizmach.

Szczegółowe uwagi merytoryczne i redakcyjne

Rozprawa została bardzo sumiennie i przejrzyście zredagowana, pojawiły się jednak pewne kwestie i niejasności, które wymagają wyjaśnienia.

1. Na stronie 19 w podrozdziale 1.3.2 (Mobility of elongated, deformable nanoobjects in a flow) przedstawiono doświadczalny model wydłużonych nanoobjektów w przepływie. Czy na wydłużenie łańcucha DNA, oprócz zawartych w rozdziale parametrów może również wpływać struktura chemiczna i sekwencja par AT i GC badanego obiektu?

2. W rozdziale 1.3.3 (Cross flow migration of particles, droplets, and deformable nanoobjects (DNA, biomolecules)) brakuje istotnego cytowania:

- C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia, S. Smith, Entropic elasticity of λ -phage DNA, Science, 265 (1994), pp. 1599-1600.

3. Na obrazach mikroskopowych przedstawionych na rysunkach 3.6B oraz 3.7 brakuje skali.

4. W podrozdziale 3.8.3 (Ionic strength effect) do badań zastosowano wodne roztwory soli : KCl, LiCl oraz NiCl₂. Proszę wyjaśnić ich wybór. Jon Ni²⁺ w roztworach wodnych oraz w krystalicznych hydratách występuje w postaci akwakompleksów: [Ni(H₂O)₆]²⁺, a wodne roztwory tej soli wykazują odczyn kwasowy, co spowodowane jest reakcją deprotonacji skoordynowanych cząsteczek wody. Czy w związku z tym pH podczas eksperymentów było kontrolowane?

5. W rozdziale 4.2.2 (Filament flexibility measurements) zaproponowano 3 metody badawcze. Czy możliwe było wykorzystanie szczypiec optycznych w badaniach modułu Younga nanofilamentów?

6. W rozdziale 4.6.1 (Nanofilament morphology) do pomiarów wysokości, średnicy oraz długości filamentów zostały wykorzystane techniki SEM i AFM. W jakich warunkach zostały przeprowadzone eksperymenty? Jak wiadomo w pomiarach za pomocą techniki SEM oraz AFM w powietrzu obserwuje się bardzo silne oddziaływanie badanego obiektu z powierzchnią (cyt. Claudio Rivetti). Szczególnie w przypadku pomiarów AFM w powietrzu biopolimerów (np. B-DNA) obserwuje się skrócenie nici DNA nawet o 8%, wywołane oddziaływaniem z powierzchnią miki oraz drastyczne zmniejszenie wysokości nawet do 0,5 nm. Proszę o komentarz.

- C. Rivetti, S. Codeluppi, Accurate length determination of DNA molecules visualized by atomic force microscopy: evidence for a partial B- to A-form transition on mica, *Ultramicroscopy* 87 (2001) 55–66

Należy podkreślić, że przedstawione przeze mnie zagadnienia do dyskusji nie są uwagami krytycznymi i nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy.

Wnioski końcowe

Doktorantka sumiennie rozwiązała rozważany w pracy problem naukowy, udowodniła postawione tezy, stosując przy tym oryginalny warsztat badawczy i konstrukcyjny, co świadczy o odpowiedniej wiedzy w zakresie biocybernetyki i inżynierii biomedycznej.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. Nr 65 z dnia 16 kwietnia 2003 r., poz. 595 z późn. zm. oraz odpowiednie Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.*

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki, dorobek naukowy Doktorantki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na oryginalność otrzymanych wyników, wysoce konstrukcyjny charakter pracy oraz doskonały dorobek Doktorantki wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Pawłowskiej.

Dr hab. Marta Kopaczyńska, Prof. PWr