



Politechnika Łódzka

Instytut Inżynierii Materiałowej
Zakład Biofizyki

O C E N A

pracy doktorskiej Pani Mgr Małgorzaty Ferenc zatytułowanej: *Właściwości biologiczne sfunkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA*

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Marii Bryszewskiej. Badania wykonano w ramach współpracy międzynarodowej z Euromed Research Institute, Engineering Division, Euro-Mediterranean University of Fez w Maroku, oraz z Přírodovědecká Fakulta, Univerzity J. E. Purkyně, Ústie nad Łabą, w Czechach. Praca obejmuje 93 strony maszynopisu, włączając w to 6 tabel, 11 rysunków, 15 wykresów, 132 pozycje literatury oraz wykaz osiągnięć doktorantki. Praca ma klasyczny układ.

Ostatnie lata, to okres bardzo intensywnie rozwijających się nanotechnologii, czemu towarzyszy pojawienie się na rynku bardzo licznych produktów wzbogaconych nanocząstkami lub wykorzystujących inne formy nanostruktur. Ze względu na bardzo wysoki stosunek powierzchni do objętości, charakterystyczny dla nanocząstek, oraz na powszechność występowania efektów kwantowych, nanocząstki wykazują niezwykle właściwości w porównaniu z obiektami makroskopowymi. Z tego też powodu mogą znaleźć zastosowanie w praktycznie wszystkich obszarach technologii poprawiając cechy dotychczasowych produktów lub też umożliwiając opracowanie i urynkowanie zupełnie nowych rozwiązań technologicznych. Dotyczy to także obszaru zastosowań biomedycznych, wśród których wiele produktów nanotechnologii znalazło już zastosowania kliniczne, najczęściej w diagnostyce, ale też coraz częściej w spersonalizowanej i celowanej terapii. Uważa się, że nanocząstki pozwolą rozwiązać problem celowanego dostarczania leków. Z tego samego powodu produkty nanotechnologii mogą przejawiać efekty biomimetyczne i wykazywać nieoczekiwaną aktywność biologiczną, a przez to stanowić realne zagrożenie dla żywych organizmów, także przez włączenie ich w łańcuch pokarmowy tych organizmów. Dlatego bardzo potrzebne są wszelkie badania nakierowane zarówno na znalezienie i wykazanie potencjalnych korzyści, jak i zagrożeń ze strony produktów nanotechnologii, co pozwoli w sposób świadomy i dobrze udokumentowany podejmować ryzyko związane z rozwojem danej technologii i z wprowadzeniem na rynek jej produktów.

Tematyka ocenianej pracy bardzo dobrze wpisuje się w najbardziej aktualny nurt badań produktów nanotechnologii, z wykorzystaniem fizyko-chemicznych i biologicznych metod oceny ich właściwości.



Instytut Inżynierii Materiałowej, Zakład Biofizyki

90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 1/15, budynek A18
tel/fax 042 631 30 61, e-mail: bogdan.walkowiak@p.lodz.pl

Komentarz ogólny:

Wstęp:

Oceniana praca rozpoczyna się dobrze udokumentowanym (na podstawie 64 pozycji literatury) wstępem, w którym omówione są zarówno mezoporowate nanocząstki krzemionkowe, jak i strategia celowanego dostarczenia leków z wykorzystaniem specyficznych ich nośników. Przytoczona literatura przedmiotu została dobrana poprawnie dla zobrazowania opisywanych procesów i zjawisk i świadczy o dobrym rozeznaniu przedmiotu badań przez Doktorantkę. Warto również zauważyć, że Doktorantka jest pierwszym autorem pracy o tytule: *Haemolytic activity and cellular toxicity of SBA-15-type silicas: elucidating the role of the mesostructure, surface functionality and linker length*. opublikowanej w 2015 roku w *Journal of Materials Chemistry B* (IF=4.726) 3: 2714–2724;

Cel pracy:

Na podstawie przedstawionego przeglądu literatury sformułowany został cel pracy określony w następujący sposób: „*Celem pracy była możliwie szeroka charakterystyka funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych typu SBA.*” Tak postawiony cel jest zdecydowanie mało precyzyjny, choć bardzo ambitny. Określenie „*możliwie szeroka charakterystyka*” może oznaczać wykorzystanie wszystkich dostępnych na tę chwilę metod doświadczalnych przydatnych do wykonania charakterystyki badanych nanocząstek. Niestety, w trakcie dalszej lektury pracy okazuje się, że zastosowane w pracy metody badawcze, jakkolwiek adekwatnie dobrane do wykonania charakterystyki nanocząstek, dalekie są od wyczerpania wszystkich dostępnych, nawet w Łodzi, metod badawczych. Kolejne zdania: „*Otwarte pozostawało pytanie, jak przyłączenie różnych grup funkcyjnych na powierzchni krzemionek, a także modyfikacje organiczne przyczyniają się do zmian właściwości mezoporowatych nanocząsteczek w stosunku do krzemionki amorficznej.*” oraz „*Postawiony cel zrealizowano poprzez scharakteryzowanie morfologii krzemionek, ich powierzchni i potencjału zeta, zbadanie ich toksyczności względem erytrocytów oraz wybranych linii komórkowych prawidłowych i nowotworowych, a także określenie oddziaływań pomiędzy tymi nanocząsteczkami a białkiem.*” znacząco zawężają i doprecyzowują postawiony cel i sposób jego realizacji, choć w dalszym ciągu pozostaje wiele niejasności. Przykładowo nie jest jasne, czy chodzi o określenie oddziaływań z jednym wybranym białkiem, czy też z dowolnymi białkami rozumianymi z punktu widzenia chemii jako białko. Poza tym nie jest jasne o jakie oddziaływania Doktorantce chodzi. Reasumując, cel pracy sformułowany został w dość niejasny i zawiły sposób.

Materiał użyty do badań:

Cztery rodzaje mezoporowatych nanocząstek krzemionkowych typu SBA, otrzymane do badań w ramach współpracy z Uniwersytetem w Fezie, Maroko:

- SBA-OH – natywna krzemionka, posiadająca na swojej powierzchni grupy hydroksylowe,
 - SBA-SH – krzemionka posiadająca na powierzchni dodatkowe grupy tiolowe,
 - SBA-NH₂ – krzemionka z dodatkowymi grupami aminowymi na powierzchni,
 - SBA-COOH – krzemionka na powierzchni której są obecne grupy karboksylowe
- oraz:
- amorficzna krzemionka pochodząca z firmy Sigma Chemical Co., USA.

Materiał biologiczny:

- erytrocyty pozyskiwane z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi,
- fibroblasty chomika chińskiego linia **B14** o nieznanym pochodzeniu,

- komórki ludzkiej ostrej białaczki szpikowej linii **HL60** zakupione w firmie ATCC (USA),
- komórki ludzkiej ostrej białaczki komórek T linii **1301** otrzymane z Banca Biologica e Cell Factory (Włochy),
- szczurze komórki raka wątroby linii **BRL** o nieznanym pochodzeniu.
- albumina ludzka pochodząca z Sigma Chemical Co., USA.

Metody badawcze:

Jak już wspomniano powyżej, metody badawcze dobrane zostały adekwatnie do postawionego celu. Wśród zastosowanych metod znalazły się:

- pomiar stopnia hemolizy erytrocytów poddanych działaniu badanych nanocząstek,
- wpływ obecności albuminy ludzkiej na obserwowany poziom hemolizy,
- ocena przeżywalności komórek testami MTT i AlamarBlue,
- badanie adsorpcji hemoglobiny i albuminy ludzkiej przez nanocząstki,
- badanie gaszenia fluorescencji albuminy ludzkiej i wolnego L-tryptofanu przez nanocząstki,
- spektrometria dichroizmu kołowego,
- pomiar potencjału zeta,
- obrazowanie nanocząstek za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM),
- obrazowanie nanocząstek za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM),
- ocena porowatości, objętości porów i powierzchni właściwej metodą adsorpcji/desorpcji azotu (modele BET i BJH),
- statystyczna ocena uzyskanych wyników z wykorzystaniem parametrycznego testu t-Studenta oraz nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya.

Zestaw zaprezentowanych metod pozwala na osiągnięcie założonego celu z ograniczeniem wskazanym w dalszej części recenzji.

Rezultaty:

Uzyskane rezultaty zaprezentowane zostały na ogół poprawnie i w czytelny sposób. Dostarczają istotnych informacji o samych nanocząstkach, jak i o ich wpływie na przeżywalność komórek w hodowli, hemolizę erytrocytów oraz oddziaływanie z hemoglobina i albumina.

Dyskusja i podsumowanie:

Najważniejsza zwykle część pracy to dyskusja pozwalająca na interpretację uzyskanych wyników, odniesienie ich do wyników dotychczas opublikowanych przez innych autorów oraz sformułowanie wniosków. W ocenianej pracy w dyskusji wyników można znaleźć zarówno próbę interpretacji uzyskanych wyników, jak i ich porównanie z danymi literaturowymi. Odnoszę jednak wrażenie, że zatracona została właściwa proporcja. Doktorantka w głównej mierze dokonuje ponownego przeglądu literatury i na tym tle próbuje umieścić uzyskane przez siebie wyniki. Problem jednak w tym, że brakuje przekonującej analizy uzyskanych wyników, a jeżeli analiza ta jest już prowadzona, to na bardzo ogólnym poziomie. Przykładowo na stronie 63 znajduje się stwierdzenie: „*Nie bez znaczenia pozostaje ponadto wielkość porów obecnych w strukturze krzemionek.*” Jednak w treści pracy, oprócz podania wartości powierzchni właściwej, rozmiarów i objętości porów nie da się znaleźć żadnej analizy korelacji tych parametrów z innymi badanymi wielkościami, takimi jak potencjał hemolityczny, cytotoksyczność, adsorpcja białek, wygaszanie fluorescencji itd. Podobnie brak jest analizy potencjału zeta.

W podsumowaniu wytłuszczonym drukiem przedstawione jest stwierdzenie: „*...modyfikowanie powierzchni krzemionek poprzez przyłączanie grup funkcyjnych oraz łączników organicznych ma kluczowe znaczenie dla właściwości mezoporowatych*”

nanocząsteczek.” Stwierdzenie to można byłoby sformułować na podstawie doświadczenia innych badaczy przedstawionego w literaturze. Nie jest tajemnicą, że inżynieria powierzchni zajmuje się właśnie celowym modyfikowaniem powierzchni materiałów, w tym nanocząstek, w celu uzyskania oczekiwanych właściwości tych powierzchni.

W związku z powyższym oczekuję wskazania przez Doktorantkę tego, co uważa za najważniejsze osiągnięcie przedstawionej do oceny pracy.

Komentarz szczegółowy:

Poniżej przedstawiam listę wątpliwości i pytań oczekując odpowiedzi podczas publicznej obrony pracy:

1. W tytule pracy mowa jest o właściwościach biologicznych funkcjonalizowanych krzemionek mezoporowatych. Jakie właściwości biologiczne Doktorantka miała na myśli formułując tytuł pracy? Dla ułatwienia dodam, że właściwości fizyczne obiektów wyrażane są przez fizyczne cechy tych obiektów, przykładowo: rozmiary liniowe, gęstość czy rozwinięcie powierzchni, właściwości chemiczne wyrażają się przez skład chemiczny obiektów, ich zdolność wchodzenia w reakcje chemiczne bądź kataliza tych reakcji itp. Natomiast właściwości biologiczne przypisujemy zwykle obiektom biologicznym uczestniczącym w procesach życiowych żywych organizmów. W odniesieniu do obiektów, które nie posiadają cech biologicznych zwykle mówimy o ich biologicznej ocenie wykorzystującej metody znane w biologii.
2. W literaturze przedmiotu przyjęto terminologię wyraźnie różnicującą cząstki i cząsteczki. Przyjęto, że określenie cząsteczki dotyczy molekularnych struktur chemicznych, natomiast określenie cząstki przyjęto używać w odniesieniu do cząstek elementarnych i innych obiektów, w stosunku do których można przyjąć określenie drobiny, w tym nanodrobiny – nanocząstki. Stąd pytanie dlaczego Doktorantka zdecydowała się używać formy „nanocząsteczka”, zresztą niekonsekwentnie, bo w kilku przypadkach w treści pojawia się forma „nanocząstka” lub „cząstka”.
3. Nie jest jasne co oznacza określenie „wydajność biologiczna” zastosowane w odniesieniu do mezoporowatych nanocząstek.
4. Do badań Doktorantka wykorzystwała cztery zmodyfikowane formy mezoporowatych nanocząstek krzemionkowych zmodyfikowanych obecnością różnych grup. Do momentu oceny porowatości można odnieść wrażenie, że są to strukturalnie analogiczne nanocząstki różniące się tylko obecnością różnych grup funkcyjnych na powierzchni. Dopiero później okazuje się, że są to strukturalnie odmienne nanocząstki, które z natury rzeczy powinny w różny sposób oddziaływać z obiektami biologicznymi. Poproszę o uzasadnienie porównania tak odmiennych obiektów.
5. Poproszę o uzasadnienie wyrażenia polarności w jednostkach długości (w tabeli 1, str. 25).
6. W jakim celu stosowano schłodzone roztwory w preparatyce erytrocytów prowadzonej w temperaturze 21-24°C?


7. Zdaje się, że mezoporowate nanocząstki krzemionkowe są nierozpuszczalne. W jaki sposób Doktorantka uzyskiwała roztwory tych nanocząstek (str. 29 i dalej)? Czy to tylko pomylenie pojęcia roztworu z pojęciem zawiesiny?
8. Jak rozumieć dopływ 5% CO₂ w warunkach hodowli komórkowej? Czy chodziło o utrzymanie 5% stężenia tego gazu w atmosferze hodowli?
9. Komórki w warunkach hodowli standardowej (kontrolnej) także umierają, oczywiście w niewielkim odsetku. Dlatego określenie: „*Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane (NT), których żywotność przyjmowano jako 100%.*” jest niepoprawne. Poproszę o zaproponowanie poprawnego opisu kontroli.
10. Tłumaczenie terminu „Laser Doppler Micro-Electrophoresis” jako elektroforezy laserowej Dopplera wydaje się być błędne. Z definicji elektroforeza to zjawisko ruchu obiektów posiadających ładunek elektryczny w polu elektrycznym. Do jakiego procesu odnosi się efekt Dopplera w urządzeniu wykorzystanym do pomiaru potencjału zeta?
11. Zaproponowane przez Doktorantkę testy statystyczne są dobre dla porównania dwóch grup wyników doświadczalnych. W przypadku ocenianej pracy liczba grup była większa i dokonywano wielokrotnego porównania wyniku badania uzyskanego dla kontroli z wynikami badania uzyskanymi dla różnych nanocząstek zastosowanych w różnych stężeniach. Dlatego przedstawione w pracy wnioskowanie statystyczne jest błędne i powinno zostać poprawione. Jakie testy statystyczne powinna Doktorantka zastosować i na ile może to zmienić wnioskowanie?
12. Jaka część obserwowanego efektu wygaszania fluorescencji związana jest z rzeczywistym wygaszaniem, a jaka wynika z ubytku albuminy w roztworze z powodu jej adsorpcji na krzemionce (str.51)?
13. Jakie szczególne znaczenie mają wielkości zaznaczone kolorem czerwonym w tabeli nr 4?
14. W jakim celu prezentowane są wyniki uzyskane z wykorzystaniem AFM. Nic z nich nie wynika, a przynajmniej nie znalazłem znaczenia tych wyników w treści pracy. Na zdjęciach uwidocznione są ślady operacji analitycznych i z nich też nic nie wynika dla treści pracy.
15. Co Doktorantka osiągnęła poprzez pomiar potencjału zeta? Na ile lepiej poznała powierzchnie nanocząstek?
16. Jak rozumieć stwierdzenie: „*Wykazano, że stabilne oddziaływania elektrostatyczne zachodzą pomiędzy zakrzywioną powierzchnią krzemionki i głowami lipidów budujących dwuwarstwę, która stanowi podstawową strukturalną część błony komórkowej.*”? Szczególnie jaką zakrzywioną powierzchnią Doktorantka miała na myśli?
17. Jeżeli Doktorantka przywiązuje szczególną wagę do kontaktu mezoporowatych nanocząstek krzemionkowych z krwią, a szczególnie z erytrocytami, co może mieć istotne znaczenie przy dostarczaniu leków związanych z nanocząstkami drogą

naczyniową, to dlaczego nie zastosowała komórek śródbłonna, wyścielających ściany naczyń krwionośnych, do obserwacji oddziaływania z badanymi nanocząstkami? Dobór zastosowanych w pracy komórek wydaje się być dość przypadkowy. Komórki śródbłonna mają zdolność pochłaniania różnorodnych obiektów, w tym tak dużych jak mikrometrycznych rozmiarów kryształy diamentu (Diamond and Related Materials, 2009; 18:4, 651-656).

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i uwag krytycznych stwierdzam, że praca jest wartościowa, wnosi istotne wartości poznawcze i spełnia wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o dopuszczenie Pani Mgr Małgorzaty Ferenc do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora.

Dobra Nowiny, 12 czerwca 2016 roku

Handwritten signature of Bogdan Walikow in black ink.