

Kraków 17.05.2019

Dr hab. inż. Roman Major prof. PAN

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN

Ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Łucja Dybowska-Sarapuk pt.
„Opracowanie technologii wytwarzania biozgodnego, przewodzącego atramentu
grafenowego”

Nic nie jest twórcze, jeśli nie jest oryginalne w niebanalny sposób.¹

5 października 2010, The Royal Swedish Academy of Sciences zdecydowała o przyznaniu Nagrody Nobla w dziedzinie fizyki za rok 2010

*“for groundbreaking experiments regarding the two-dimensional material graphene”.*²

Nagroda Nobla została przyznana Andre Geim z University of Manchester, UK oraz Konstantin Novoselov University of Manchester, UK.

Grafen – perfekcyjna sieć atomowa

Cienki płat zwykłego węgla, o grubości zaledwie jednego atomu, leżał u podstaw Nagrody Nobla zaledwie sześć lat po jego odkryciu w dziedzinie fizyki. Geim i Novoselov pokazali, że węgiel w takiej płaskiej formie ma wyjątkowe właściwości, które wywodzą się z niezwykłego świata fizyki kwantowej.

Można powiedzieć bez ryzyka błędu, iż grafen kumuluje w sobie najszerze, spośród znanych materiałów, spektrum możliwych do wykorzystania właściwości. Właśnie ta wielość w jednym otwiera fascynujące perspektywy. Rynek zastosowań medycznych grafenu budowany jest wokół jego właściwości bakteriostatycznych i bakteriobójczych, które

¹ [J. Trzebiński, Z badań nad uwarunkowaniami oryginalności myślenia, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wrocław 1978, s. 6.]

² Scientific Background on the Nobel Prize in Physics 2010 GRAPHENE compiled by the Class for Physics of the Royal Swedish Academy of Sciences

w zastawieniu z wybranymi pozostałymi cechami otwierają niezwykle szerokie pole nowych możliwości.

Rozprawa pani mgr inż. Łucji Dybowskiej-Sarapak pt. „Opracowanie technologii wytwarzania biozgodnego, przewodzącego atramentu grafenowego” dobrze wpisuje się w ten kierunek badań.

Praca ma charakter podstawowy i dotyczy rozwoju technik drukowanych dla aplikacji biomedycznych, tzn. wytworzenie inteligentnej powierzchni na urządzeniach i materiałach medycznych narażonych na niekontrolowane namnażanie bakterii.

Praca zawiera 191 stron, 29 tabel, 70 rysunków. Część teoretyczną oraz aktualny stan wiedzy z zakresu pracy oparto na 268 pozycjach literaturowych. Praca ma typowy układ prac doktorskich. Składa się z dziesięciu głównych rozdziałów. Część teoretyczna została przedstawiona na 37 stronach, na stronie 7 przedstawiono wykaz skrótów. Pozostała część pracy dotyczy opisu zastosowanego materiału badań, metodyki badań, wyników i dyskusji oraz zawiera podsumowanie i wnioski.

Ocena części teoretycznej:

W części teoretycznej przedstawiono opis materiałów grafenowych oraz materiałów hydrofazowych i hydrożeli. Już na samym początku lektury niniejszej pracy, czytelnik ma wrażenie, że ma do czynienia z pracą bardzo dojrzałego naukowo autora i specjalisty w swojej dziedzinie. Autorka posługuje się bardzo poprawnym językiem polskim. Opisy przedstawiono czytelnie, chociaż opisywana tematyka jest trudna. W części teoretycznej zebrano najważniejsze informacje dotyczące grafenu, które pojawiły się we wiodących czasopismach z tej dziedziny. W części teoretycznej, oprócz przedstawienia dokładnych studiów literaturowych, pojawiają się dodatkowe komentarze, które pomagają czytelnikowi na właściwą interpretację i zabezpieczają przed błędnie stosowaną terminologią. Prac dotyczących grafenu jest bardzo dużo. Obserwowalny nagły wzrost publikacji z dziedziny grafenu obserwuje się po roku 2010, czyli po ogłoszeniu Nagrody Nobla z dziedziny fizyki. Taka moda na grafen spowodowała wysyp bardzo ważnych i ciekawych publikacji, ale również pojawiły się doniesienia, w których autorzy błędnie posługiwali się terminologią.

Doktorantka na str. 19 podkreśla, że w wielu publikacjach autorzy używają ogólnego określenia „grafen” opisując prace nad zupełnie odmiennymi materiałami. Często weryfikacja stosowanej terminologii z metodyką badań, wskazuje, iż publikacja nie dotyczy zachowujących unikalne właściwości materiałów węglowych, takich jak monowarstwa grafenu czy nanopłatki

grafenowe, ale nieprzewodzącego tlenku grafenu, lub zredukowanego, często w trudnych warunkach, tlenku grafenu.

Fragmenty, gdzie Autorka zwraca uwagę na błędy w nomenklaturze i błędną interpretację pojawiają się w kilku miejscach pracy w części teoretycznej. Kolejny fragment tego typu dotyczy właściwej interpretacji i zrozumienia właściwości antibakteryjnych grafenu. Potocznie przyjmuje się, że potencjalna toksyczność nanocząstek, także nanocząstek materiałów grafenowych, związana jest z ich interakcją z błoną komórkową, która skutkuje fizycznym uszkodzeniem membrany lipidowej. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że grafen nie wykazuje istotnej cytotoksyczności względem komórek zdrowych. Na str. 26 pojawia się wartościowy opis, w którym pani mgr inż. Łucja Dybowska-Sarapuk przedstawia trzy mechanizmy bezpośredniego niszczenia komórek nowotworowych oraz bakterii, przede wszystkim przez nanopłatki grafenowe oraz tlenek grafenu. Te dwa fragmenty zwróciły moją szczególną uwagę podczas lektury części teoretycznej.

Jednak w przypadku drugiego fragmentu, w którym Doktorantka interpretuje wpływ płatków grafenowych na komórki, miałem jednak wrażenie jakby Autorka rozpoczynała tę samą myśl dwukrotnie. Na stronie 28 pojawia się podobny zapis jak na stronie 26, uzupełniony o graficzną interpretację teorii wyjaśniających toksyczność grafenu i dopiero na kolejnych stronach pojawia się właściwy opis wyżej wymienionych mechanizmów.

Podczas studiów literaturowych Doktorantka dotarła do najnowszych i najciekawszych interpretacji dotyczących toksycznego wpływu powierzchni pokrytych grafenem względem bakterii.

Na stronie 31 Autorka przechodzi do interpretacji terminu Inżynierii Biomedycznej z uwzględnieniem samej genezy pojęcia. Opis, interpretacja i definicja zagadnienia jest poparta szerokim przeglądem literaturowym. Właściwe przedstawienie dziedzin interdyscyplinarnych, jaką jest bez wątpienia Inżynieria Biomedyczna, nie jest zadaniem łatwym. Nauka ta skupia w sobie wielorakie nauki z dziedziny techniki, medycyny i biologii. Oceniam tą część również bardzo wysoko.

W podsumowaniu rozdziału 2.1 Doktorantka wyraża swoją opinię, że *„...należy stwierdzić, iż możliwość zastosowania najnowszych osiągnięć inżynierii materiałowej na polu inżynierii tkankowej cieszy się coraz większym zainteresowaniem ze strony środowisk naukowych, a dostępne doniesienia literaturowe potwierdzają fakt, iż grafen i materiały grafenowe stanowią doskonałe podłoża do zastosowań w tym obszarze.*

Jednakże, aby możliwe było zastosowanie grafenu w opisanych wyżej aplikacjach medycznych, szczególnie w inżynierii tkankowej, niezbędne jest opracowanie zarówno

specjalnych technik i metod jego nanoszenia, jak i materiałów, zwanych heterofazowymi atramentami, w których GNP mogą być przenoszone na różnego rodzaju medyczne podłoża.”

Uważam, że spostrzeżenie to jest słuszne, jednak przy tej części chciałbym podjąć polemikę z panią mgr inż. Łucją Dybowską-Sarapuk. Zdaniem Doktorantki opracowanie materiałów, zwanych heterofazowymi atramentami jest jedyną i najlepszą techniką zastosowania grafenu w wymienionych zastosowaniach biomedycznych. Zgadzam się z tym, że technika ta jest jedną z najnowocześniejszych i bardzo obiecującą, natomiast zabrakło mi w tym miejscu odniesienia się do innych rozwiązań technologicznych. Moim zdaniem każdy pasjonat nauki jest w pewnym sensie przewrażliwiony na punkcie swojej dziedziny i rozwiązań. Taką pasję również widzę czytając opracowanie w postaci niniejszej pracy doktorskiej, dlatego z jednej strony można uznać ten fragment za niepełny, a z drugiej strony ocenić bardzo wysoko zaangażowanie i wnikliwość w bardzo wąski i zarazem trudny zakres tematyczny.

Rozdział 2.2, rozpoczynający się na stronie 33 dotyczy atramentów heterofazowych i hydrożeli. Na początku tego rozdziału na Rys. 4 Doktorantka przedstawia schemat metod wykorzystywania nanomateriałów w biomedycynie. Uważam, że ilustracja za pomocą prostych schematów opisywanych zagadnień jest bardzo wartościowa i ważna. Praca doktorska powinna służyć innym badaczom. Pani Dybowska-Sarapuk bardzo dobrze to rozumie i wzorowo przedstawia złożone zagadnienia naukowe i technologiczne w bardzo przystępny sposób. Zabrakło w tej części wzmianki o wielu innych technikach wprowadzania nanomateriałów do hodowli komórkowej jak np. o wprowadzaniu za pomocą powłok. Chciałbym zwrócić uwagę, że powłoka i warstwa to nie jest to samo i terminy te nie mogą być używane zamiennie.

W tym rozdziale pojawiają się jedynie nieliczne błędy w konstrukcji zdania np. str. 33 pierwszy akapit, zdanie nie powinno zaczynać się od słowa „*Jednakże ...*” .

W kolejnych częściach tego rozdziału pojawia się również zamiennie interpretowane pojęcie „... *powłoka ...*” raz rozumiana jako powłoka, raz jak warstwa.

Autorka jednoznacznie stwierdza „...*Do nanoszenia nanomateriałów w postaci warstw, jak i drukowania komórek, wykorzystywane są kompozytowe materiały, zwane atramentami biologicznymi, bioatramentami lub hydrożelami...*”. Uważam, że takie zdanie jak najbardziej mogłoby się pojawić, ale również z uwzględnieniem innych technik. Mnogość możliwości inżynierii materiałowej jest tak duża, że stawianie jednoznacznych opinii może w niektórych przypadkach nie być właściwe.

Rozdziały 2.2.1 i 2.2.2 wprowadzają już czytelnika do kluczowych zagadnień pracy. Do tych rozdziałów nie mam zastrzeżeń.

Ocena części dotyczącej celu i hipotez badawczych:

Kolejna polemika dotyczy sformułowania celu. Cel, wg wytycznych [DIN 69905] jest to weryfikowalny efekt i/lub żądanie zrealizowania całego zakresu zadań w projekcie. Aby umożliwić dokonanie skutecznej weryfikacji powodzenia pracy lub projektu, musi on być kwantyfikowalny, tj. mierzalny, ponieważ cele są pomocne jedynie wtedy, gdy można je przekształcić w zdefiniowane cele ilościowe. Oczywiście jest, że poprawnie zdefiniowane muszą one być także osiągalne.

W procesie formułowania celów ważną rolę pełni zasada SMART, która informuje jak powinny wyglądać cele. Akronim SMART (z ang. Specific, Measurable, Achievable, Realistic, Time-bound) rozumie się następująco.

- S - skonkretyzowane, cele muszą być jasne i zrozumiałe dla wszystkich,
- M - mierzalne, cele powinny być możliwe do zmierzenia za pomocą odpowiednich wskaźników,
- A - akceptowalne, wykonawcy muszą najpierw zaakceptować cel, aby projekt mógł się rozpocząć,
- R - realne, cele powinny być możliwe do osiągnięcia, w odniesieniu do posiadanych zasobów,
- T - terminowe, cele muszą zostać zrealizowane zgodnie w planem. (Piwoni-Krzeszowska E.i inni 2014, s. 220-221)

Na podstawie tej definicji wg Stowarzyszenia Project Management Polska, uważam, że zaproponowane cel główny rozprawy powinien dotyczyć nie „... opracowania technologii...”, a „... opracowanej technologii...”.

Na stronie 39 został sformułowany cel naukowy pracy, co wg wytycznych IPMA Polska uważam za niepotrzebne.

Na stronie 39 pojawia się fragment „*Osiągnięcie opisanego wyżej celu pracy wymaga zrealizowania wieloetapowego planu badawczego ...*”. Zgodnie z wytycznymi IPMA klasyfikacja celu została przeprowadzona przez Doktorantkę prawidłowo, czyli wyznaczenie celu głównego, tego, który stanowi całość pojedynczych celów związanych z efektem projektu i przebiegiem zadań, definiowanych jako produktowe. Zabrakło jedynie zastosowania prawidłowej nomenklatury. Zamiast sformułowania „...*wieloetapowy plan badawczy...*” sugerowałbym stwierdzenie „...*cele produktowe ...*”.

Zgodnie z wytycznymi IPMA Polska mamy do czynienia z jednym celem głównym, który jest osiągalny poprzez osiągnięcie celów produktowych.

Ocena części doświadczalnej:

Część doświadczalna pracy została przedstawiona bardzo czytelnie. Oceniając pracę naukową, konieczna jest możliwość odtworzenia eksperymentu. W przypadku obecnej pracy, doświadczenie jest opisane bardzo dokładnie, co umożliwia czytelnikowi wyniesienie praktycznej wiedzy.

W podrozdziale „4.1 *Technologia wytwarzania grafenowych atramentów heterofazowych*” przytoczono na początku cel główny pracy tożsamy z celem głównym przedstawionym w rozdziale „3. *Cel pracy*”. Mam w tym miejscu zastrzeżenie. Cel główny jest jeden i w pracy naukowej mimo tożsamerego jego przedstawienia proponowałbym przytaczać również brzmienie takie samo. Wg mnie niepotrzebnie w rozdziale dotyczącym metodyki badawczej przytaczany jest cel główny. W dalszej części rozdziału 4.1 Doktorantka przedstawia bardzo dokładnie technologię wytwarzania atramentów heterofazowych. Bardzo cenne są komentarze praktyczne Autorki jakie reakcje badacz powinien obserwować, a jakie reakcje nie są wskazane. Dodatkowo na stronie 42 przedstawiono schemat Rys. 5 ilustrujący protokół prowadzonego eksperymentu.

W rozdziale 4.2 przedstawiono technologię wytwarzania przewodzących ścieżek i warstw grafenowych. Tok myślowy metodyki badawczej jest bardzo logiczny i czytelny. Mam uwagę do fragmentu na str. 44 „*Natomiast dzięki wykorzystaniu technologii powlekania natryskowego można w łatwy sposób wykonywać warstwy i powłoki na dużych powierzchniach, o porównywalnych grubościach 0.1-0.8 μm*”. Uważam, że zdanie nie powinno zaczynać się od słowa „*Natomiast ...*”. Doktorantka pisze o możliwości nakładania na duże powierzchnie. W pracy naukowej o charakterze technicznym ogólniki tego typu nie mogą mieć miejsca. Należy precyzyjnie podać wartość lub zakres wielkości.

- Jak został dobrany zakres grubości powłok?

Podrozdział 4.2.1 dotyczy technologii wytwarzania ścieżek grafenowych. Oprócz czytelnych opisów, rozdział ten wzbogacono również o cenne ilustracje. Uważam, że zdanie „*Parametry formowania kropli są to przebiegi sterujące pracą głowicy...*” powinno brzmieć inaczej, nie jest wg mnie sformułowane poprawnie. Nie mam uwag do reszty opisów i schematów.

Nie mam uwag do podrozdziałów 4.2.2 i 4.2.3.

Podrozdział 4.3 dotyczy zastosowanych w pracy metod badawczych. Zastosowane w pracy metody otrzymywania materiałów oraz zastosowane metody badawcze uświadamiają czytelnika o wartości pracy oraz o profesjonalizmie Doktorantki. W dość krótkim czasie opanowanie trudnego zagadnienia o charakterze interdyscyplinarnym. Zaplanowana metodyka badawcza wymagała również przemyślenia, aby uzyskane wyniki stanowiły całość, a nie były zlepkiem badań przeprowadzonych jedynie dla zasady. Uważam, że w tej kwestii Doktorantka wykazała się profesjonalizmem w planowaniu badań i właściwej selekcji zastosowanych technik.

W rozdziale 4.4 przedstawiono metodykę badawczą do oceny biozgodności. Ocena biozgodności oraz badania mikrobiologiczne stanowią dwa odrębne bardzo szerokie i skomplikowane do wykonania działy. Doktorantka decydując się na tak szeroki wachlarz badań udowodniła również odwagę eksperymentatora. Badania z organizmami żywymi są badaniami trudnymi metodycznie. Nie zawsze hodowla zachodzi prawidłowo, a konieczność zastosowania właściwej statystyki wpływa na konieczną mnogość wykonania żmudnych i długotrwałych eksperymentów. Doktorantka wspomina, że badania tego typu prowadzone były przy współpracy z innymi jednostkami badawczymi, ale mimo wszystko Doktorantka uczestniczyła w preparatyce i badaniach. Dokonanie to nie zostało podkreślone w pracy, natomiast jako osoba prowadząca tego typu eksperymenty zdają sobie sprawę jaki nakład pracy został włożony. Zasluguje to na pochwałę i uznanie.

Pierwsze zdanie w podrozdziale 4.4.1 nie powinno zaczynać się od wyrazu „*Ponieważ...*”. Doktorantka pisze: „... w pracy zbadano oddziaływanie GNP na dwa dodatkowe rodzaje komórek...”. Nie jest jasne, czy badania cytotoxyczości przeprowadzono na trzech typach komórek, czy nastąpiło przejęzyczenie i badania przeprowadzono na dwóch typach komórek.

Eksperyment prowadzono przy współpracy z wiodącą i znana jednostką badawczą w tym zakresie. Opis metodyki badawczej nie budzi zastrzeżeń. Zabrakło na wstępie wzmianki dotyczącej normy wg której wykonani test cytotoxyczości. **Brak również wstępu, czy badania prowadzono metoda bezpośrednią, czy z zawiesiny.**

W przypadku rozwijania nowych biomateriałów dedykowanych do medycyny lub biologii, wskazane jest przeprowadzenie testu genotoxyczości. Nie jest to konieczne w przypadku materiałów rozwijanych jako materiały ewolucyjne. W przypadku ocenianej pracy mamy do czynienia z materiałami rewolucyjnymi i badania tego typu są wskazane. Wskazane byłoby również przeprowadzenie badań przeżyciowych przy wykorzystaniu np. jodku propidyny oraz dioctanu fluoresceiny.

- Czy Doktorantka rozważała lub rozważyłaby ewentualne użycie sondy MitoTracker® zawierającej chlorowco-reaktywne reszty tiolowe do oznaczania aktywnych mitochondriów?

W ocenie biogodności oprócz techniki cytometrii przepływowej wskazane jest również zastosowanie techniki mikroskopii konfokalnej. Cytometria przepływowa i mikroskopia konfokalna są to bardzo pokrewne techniki badawcze, jednak obie te techniki uzupełniają się wzajemnie i uzyskane wyniki są wiarygodne.

Do przeprowadzenia badań stymulacji prądowej wybrano mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej. Przedstawione przez Doktorantkę uzasadnienie celowości wyboru komórek całkowicie mnie przekonuje i nie mam uwag do tej części opisów.

Mam pytania dotyczące prowadzonych obserwacji:

- Czy badania (Time laps) prowadzono w warunkach przeżyciowych?**
- Jakie barwniki zastosowano, aby uniknąć efektu cyto i fototoksycznego na komórki?**
- Czy badania prowadzono w warunkach inkubacji? Doktorantka opisała temperaturę i przepływ CO₂, natomiast to jeszcze nie wystarcza do prowadzenia prawidłowo badań w warunkach inkubacyjnych. Czy wprowadzono wilgotność w postaci pary wodnej w pole obserwacji?**
- Czy dokonane obserwacje przeprowadzono na mikroskopie szerokopolewym, czy mikroskopie konfokalnym?**
- Jaka była metoda detekcji w przypadku obserwacji mikroskopowych?**

Kolejna część pracy, rozdział 4.4.3 dotyczy oceny antyseptyczności warstw grafenowych.

W tej części pracy nasuwają się następujące pytania:

- Wg jakiej normy wykonano badania interakcji z bakteriami?**
- Co stanowiło kryterium doboru bakterii do badań?**
- Dlaczego do sterylizacji materiałów wybrano tlenek etylenu?**
- Dlaczego sterylne szklane probówki zawierały 10 ± 0.5 ml ciekłego ośrodka do infuzji mózgu (Graso)? Czy jest to zalecane medium w tym rodzaju badań?**
- Dlaczego 0.5 ml zawiesiny zawierającej bakterie stephylococcus inokulowano? Czy wynikało to z protokołu doświadczenia?**
- Dlaczego bakterie przygotowano o gęstości 0.5 w skali McFarlanda? Co to jest za skala?**

Do kolejnej części tego rozdziału nie mam pytań, ani zastrzeżeń. Opisy są bardzo dokładne i czytelne.

Podrozdział 4.4.4 dotyczy technologii wytwarzania nanopłatków grafenowych dekorowanych nanocząstkami srebra. Zastosowania nanocząstek srebra do poprawy

właściwości antybakteryjnych jest uzasadnione, ponieważ znane są od wielu lat właściwości antybakteryjne srebra. Doktorantka przytacza również potencjalne zastosowanie, które w świetle opracowywanego materiału wydaje się bardzo realne. Mam jednak w tym miejscu pytanie natury polemicznej:

- Czy istnieje zagrożenie przedostania się nanocząstek srebra do krwiobiegu i wpływu na czynniki krzepnięcia? Jeżeli tak, czy nie jest zasadne wykonanie w przyszłości badań oceny czasu protrombinowego (PT) oraz czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) ?

PT stosuje się w celu oceny zewnątrzpochodnego czynnika krzepnięcia. Jego wartość jest zależna od stężenia czynników krzepnięcia takich jak czynnik II, czynnik V, czynnik VII, czynnik X i fibrynogen. APTT mierzy aktywności czynników krzepnięcia krwi w osoczu. Aktywowany kaolinem czas częściowej tromboplastyny- jeden z wskaźników krzepnięcia krwi, jest ona miarą aktywności czynników krzepnięcia osocza takich jak czynniki XII, XI, IX i VIII. Tworzą nierozzerwalny system aktywacji protrombiny⁷. Wg mnie włączenie tego typu badań w przyszłości mogłoby uzupełnić wiedzę o tych materiałach i przybliżyć je do realnego zastosowania.

Doktorantka w tym rozdziale pisze: „*Mikrostruktura otrzymanego proszku GNP/nAg oceniana była na podstawie mikroskopowych obrazów uzyskanych przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego*”.

- Jakie było napięcie przyspieszające elektronów w zastosowanej technice badawczej?

Rozdział 5 dotyczy opracowania kompozycji biozgodnych, przewodzących atramentów grafenowych. Doktorantka wspomina, że jednym z głównych wyzwań elektroniki drukowanej jest skomponowanie materiałów heterofazowych, zwanych atramentami lub tuszami. Uważam, że nie jest to opinia przedstawiona na wyrost. Opracowanie materiałów heterofazowych w postaci tuszy dedykowanych do technologii elektroniki drukowanej jest zagadnieniem bardzo aktualnym a zarazem bardzo nowoczesnym. Wytworzenie tego typu materiałów jest trudne. Jednym z problemów jest wytworzenie jednorodnego, stabilnego atramentu bazującego na nanopłatkach grafenowych. Podobne problemy mieli inni autorzy opracowujący tego typu materiały. Na str. 63 na rysunku 21 przedstawiono problemy związane z wytwarzaniem i zastosowaniem grafenowych atramentów heterofazowych bazujących na nanopłatkach grafenowych. Schemat ten został przygotowany na podstawie własnych doświadczeń Autorki zestawionych z doniesieniami innych badaczy. Stanowi to cenne źródło informacji.

Nasuwają mi się następujące pytania do tego rozdziału:

Dot. Rys. 22 Warunki stawiane biozgodnym atramentom.

- Czy warunek biologiczny nie jest zbyt okrojony i potraktowany zbyt łagodnie?
- Co Autorka sądzi o wpływie mutagennym, genotoksycznym?
- Czy cytotoksyczność, o której mowa w tym schemacie powinna być wykonana zgodnie z wytycznymi ISO 10993, czy innej normy? Ewentualnie jakiej?
- Czy parametr biozgodności wynikający z badań in vivo nie ma znaczenia? Jeżeli nie to dlaczego?
- Jakiego typu modele zwierzęce byłyby konieczne, aby jednoznacznie stwierdzić przydatność biologiczną in vivo?
- Czy w przypadku ewentualnych badań in vivo badania reaktywności śródskórnej miałyby znaczenie?
- Czy w przypadku elektroniki drukowanej dedykowanej do stymulacji komórek, w przypadku oceny in vivo miałyby znaczenie badanie histologiczne tkanika wątroby, grasicy, płuc i serca? Czy w tym przypadku konieczne byłoby zwrócenia uwagi na inne organy?

Badania cytozgodności wybranych komponentów atramentów grafenowych wykonano przy wykorzystaniu m. in. mikroskopii elektronowej Rys. 27.

- Jak przeprowadzono preparatykę materiałów biologicznych?

W rozdziale 6 przedstawiono inwencję twórczą Doktorantki. W ramach realizacji pracy doktorskiej zostało opracowane stanowisko do druku strumieniowego. Za tą część pracy należy się kolejna pochwała. Rozdział ten dowodzi, że mamy do czynienia nie tylko z bardzo dobrym badaczem, ale również konstruktorem. Dostosowanie zaplecza aparaturowego do potrzeb prowadzonych eksperymentów utwierdza mnie w bardzo wysokiej mojej ocenie przedstawionej mi do recenzji dysertacji. Stworzono własne, oryginalne stanowisko do wykonania prób druku. Należy podkreślić, że stanowisko opracowane w ramach pracy doktorskiej przewyższa możliwościami urządzenia komercyjnie dostępne dedykowane do druku strumieniowego. Dostępne urządzenia nie są odpowiednio przystosowane do druku heterofazowych atramentów ze względu na brak dysz umożliwiających drukowanie atramentów zawierających niskowrzące rozpuszczalniki co zostało uwzględnione w oryginalnym rozwiązaniu zaproponowanym przez Panią Łucję Dybowską-Sarapuk. Układ zaproponowany przez Doktorantkę został przystosowany w celu zapewnienia czystości i sterylności procesu druku.

Na stronie 82 pojawia się jednak następujące stwierdzenie: *„Wymienione wyżej czynniki spowodowały, że jednym z głównych celów pracy było zaprojektowanie i zbudowanie kompletnego stanowiska do druku strumieniowego heterofazowych, biozgodnych atramentów,*

zapewniającego sterylne warunki drukowania, umożliwiającego wytwarzanie ścieżek i wzorów grafenowych nie tylko do zastosowań w elektronice, ale także w aplikacjach biologicznych". W rozdziale 3 „Cel pracy” jako cel główny rozprawy wskazano „...opracowanie technologii biogodnego, przewodzącego atramentu grafenowego do zastosowania w wytwarzaniu warstw i wzorów nanoszonych technikami druku strumieniowego lub powlekania natryskowego na potrzeby aplikacji biomedycznych”. Nawiązując do reguł zgodnych z wytycznymi IPMA nie można mówić o dwóch celach głównych. Sugerowałbym zakwalifikowanie projektu i budowy stanowiska do celów produktowych i wykazanie tego celu w rozdziale 3 niniejszej rozprawy.

Podrozdziały 6.2- 6.4 dotyczą konstrukcji i wykonania drukarki strumieniowej. Projekt, wykonanie oraz możliwości układu robią wrażenie i ta część oceniam bardzo wysoko. Mam komentarz do rozdziału 6.4, „*Biologiczny aspekt budowy stanowiska drukarki strumieniowej*”. Uważam, że zapewnienie możliwości sterylizacji alkoholem nie jest wystarczające. Sugerowałbym zainstalowanie filtrów HEPA lub lampy UV w komorze. Współpracując z laboratoriami zajmującymi się technologiami wysokopróżniowymi dedykowanymi dla biomedycyny, widziałem tam dodatkową mobilną komorę z laminarnym przepływem powietrza, która zapewniała sterylność montażu podłoża oraz usuwanie wykonanych materiałów w warunkach septycznych. Zastosowanie takich zabezpieczeń oraz zapewnienie możliwości sterylizacji komory reakcyjnej stanowiłoby skuteczny zabieg zabezpieczający wykonane materiały przed kontaminacją.

Rozdział 7 dotyczy charakterystyki i oceny właściwości opracowanych atramentów i warstw grafenowych. Przeprowadzone badania materiałowe heterofazowych atramentów nie budzą żadnych zastrzeżeń. Rozdział 7.2.4 dotyczy badań cytotoksygodności warstw grafenowych. Do tego rozdziału mam uwagi jedynie natury polemicznej:

- Sugerowałbym posługiwanie się terminem „*cytotoksyczny*” zamiast „*cytozgodny*”. Wg ogólnie przyjętej nomenklatury termin „*cytotoksyczny*” jest częściej stosowany. Należy zwrócić jednak uwagę, że terminy „*cytotoksyczny*” i „*cytozgodny*” mają przeciwstawne znaczenie i nie mogą być wprost używane zamiennie.

W rozdziale 7.2.4 zabrakło mi analiz wykonanych przy zastosowaniu technik mikroskopii fluorescencyjnej, szerokokopolowej, a w najlepszym przypadku konfokalnej. Rozdział 8 dotyczy możliwości wdrożenia wyników pracy. Jest to bardzo ważna informacja. Uważam, że większość prac powinna mieć aspekt użytkowy. Nie jestem przeciwnikiem nauk podstawowych, ale jako praktyk zwracam szczególną uwagę na możliwości wdrożenia. Głównym miejscem aplikacji opracowanego atramentu grafenowego jest ochrona przed zakażeniami spowodowanymi cewnikowaniem pacjentów. Materiały te mogłyby być

zastosowane do wytwarzania antyseptycznych warstw m.in. na cewnikach, skutecznie blokować powstawanie biofilmu bakteryjnego, mogą przyczynić się do zmniejszenia zagrożenia zakażeniami związanymi z bakteriami gronkowca. Zastosowań antyseptycznych wytworzonego materiału jest bardzo dużo co zasługuje na pochwałę i uznanie.

W rozdziale 8.2 Autorka zwróciła uwagę, że grafen i nanopłatki grafenowe są w ostatnich czasach brane pod uwagę jako materiał używany do wzbogacenia rusztowań komórkowych zwiększający potencjał regeneracyjny komórek. Badania proliferacji oparto o obserwacje SEM co uważam za właściwe, ale niewystarczające. Technika SEM nie można obserwować procesu różnicowania komórkowego. Komórki macierzyste bez odpowiedniej kontroli mogą zacząć różnicować się niekontrolowanie. Bez możliwości dokładnego sprawdzenia procesu różnicowania nie można planować zastosowania klinicznego. W tej części sugerowałbym również zastosowanie technik fluorescencyjnych. Bardzo ciekawe natomiast jest doświadczenie dotyczące elektrostymulacji komórkowej. Wpływ na procesy różnicowania oraz proliferacji komórkowej może wynikać z topografii powierzchni, jej strukturyzowania, funkcjonalizacji i farmakologicznej, chemicznej lub elektrycznej stymulacji. W pracy proces różnicowania i proliferacji analizowany był poprzez stymulację prądową. Należy podkreślić, że wykonane eksperymenty w pracy bardzo mocno łączą się z technikami i trendami światowymi co dowodzi bardzo dogłębnego przestudiowania przez Autorkę aktualnego światowego stanu wiedzy. W tym celu Autorka zaproponowała oryginalne stanowisko do przeprowadzenia tego typu eksperymentu. Badania prowadzono na macierzystych komórkach neuralnych przy zastosowaniu techniki skaningowej mikroskopii elektronowej. Wg mnie badania te muszą być uzupełnione w dalszych etapach o badania fluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych.

Doktorantka w rozdziale 9 „*Podsumowanie i wnioski*” wyraziła opinię, że opracowane w niniejszej pracy atramenty, nanoszone technikami elektroniki drukowanej, mogą być zastosowane w wielu różnych aplikacjach inżynierii biomedycznej. Na podstawie przedstawionych wyników i przeprowadzonej ich interpretacji oraz dyskusji, uważam, że opinia Doktorantki jest jak najbardziej słuszna.

Ogólna ocena pracy:

Przytoczony na początku recenzji fragment „*Nic nie jest twórcze, jeśli nie jest oryginalne w niebanalny sposób*” bardzo dobrze wyraża moją opinię o przeczytanej i ocenianej pracy.

Praca doktorska pt. „Opracowanie technologii wytwarzania biozgodnego, przewodzącego atramentu grafenowego” autorstwa mgr inż. Łucji Dybowskiej-Sarapuk przedstawia ciekawe opracowanie naukowe dotyczące rozwoju dziedziny inżynierii biomateriałów. Badania dotyczą biomateriałów do zastosowań jako materiały antyseptyczne oraz dedykowane do elektrostymulacji prądowej. Pomimo uwag, jedynie natury polemicznej, uważam, że praca jest przygotowana czytelnie i bardzo starannie. Wyniki badań są unikatowe i bardzo ciekawe. Imponujący jest wachlarz zastosowanych metod, które zrealizowano w taki sposób, że wyniki badań uzupełniają się i ogólnie stanowią spójną całość. Moja ocena pracy jest wysoka i po uwzględnieniu niewielkich zmian powinna zostać opublikowana w postaci monografii książkowej, co mogłoby stanowić cenne źródło informacji. Stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska odpowiada wymogom stawianym do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk technicznych w dyscyplinie Budowa i Eksploatacja Maszyn przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie sztuki z dnia 14.03.2003 r. (Dz. U. poz. 595 z 2003 roku).

Wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Łucję Dybowską-Sarapuk do obrony przed Radą Wydziału Mechatroniki Politechniki Warszawskiej w Warszawie. Zważywszy na wysoki poziom pracy wnoszę równocześnie o jej wyróżnienie.

Dr hab.inż. Roman Major prof. PAN

