



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Warszawa, 25.10.2017

Prof. dr hab. Agata Michalska-Maksymiuk
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pasteura 1, 02-093 Warszawa
agatam@chem.uw.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej „Submikronowe materiały hybrydowe oparte na funkcjonalizowanych tyminą polimerach syntetycznych i naturalnych”
Pani mgr Agnieszki Gut**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska „Submikronowe materiały hybrydowe oparte na funkcjonalizowanych tyminą polimerach syntetycznych i naturalnych” Pani mgr Agnieszki Gut została przygotowana w grupie prof. dr hab. Krzysztofa Szczubiałki, w grupie badawczej mającej ogromne doświadczenie i sukcesy w badaniu polimerów syntetycznych i naturalnych potencjalnie użytecznych w różnych zastosowaniach, w tym także biomedycznych i analitycznych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma tradycyjny układ, podzielona została na dwie główne części: przegląd literatury (część teoretyczna) i opis wyników badań własnych (część doświadczalna). Ponadto w rozprawie zawarto wprowadzenie zawierające cel pracy oraz podsumowanie i wnioski, jak również spis cytowanej literatury, jak to określono „ważnych” skrótów i spis rysunków.

Za główny cel Autorka postawiła sobie „wykorzystanie polimerów syntetycznych i zmodyfikowanych polimerów naturalnych podstawionych grupami tyminy do otrzymania materiałów hybrydowych o korzystnych w aspekcie aplikacyjnym właściwościach”. Założony cel rozprawy w moim przekonaniu został osiągnięty – w rozprawie zbadano polimery podstawione grupami tyminowymi i ich oddziaływanie z jonami rtęci(II), a także z pochodnymi adeniny, uzyskano materiały o korzystnych właściwościach, co dobitnie pokazuje ostatni rozdział części rozprawy dotyczącej badań własnych opisujący nowe sensory fluorymetryczne.

W części literaturowej Autorka opisała w dość ogólny sposób klasyfikację i właściwości polimerów. W zaprezentowanym ogólnym opisie razi pomieszanie cech polimerów (np. „zależność ich masy i dyspersyjności od źródła pochodzenia, immunogenność oraz konieczność ich izolacji z często skomplikowanych matryc biologicznych”, str. 26.).

Opis polimerów naturalnych i syntetycznych zawarty w rozprawie jest niezwykle lakoniczny – obejmuje (z rysunkami) niewiele ponad sześć stron. W tak szczupłej objętości tekstu wiele informacji podanych jest w formie haseł bez głębszego (w mojej opinii) przemyślenia i usystematyzowania podawanych informacji.

W moim przekonaniu wartość pracy znacznie by podniosło przedyskutowanie właściwości protolitycznych polialliaminy; szczególnie iż Autorka podkreśla wykorzystanie tego polimeru do otrzymywania struktur polielektrolitowych metodą warstwa po warstwie, czy wymienia wykorzystanie tego związku do otrzymywania kompleksów polielektrolitowych z kwasem poliakrylowym. Te zastosowania, jak i inne wymienione wymagają obecności polimeru w roztworze w określonej formie, a więc zachowania odpowiednich warunków pH, a pomocne może być uwzględnienie pK_a grup aminowych w polimerze. Ponadto na Rysunku 1 Autorka przedstawiła wzór chlorowodoru polialliaminy, a w części rozprawy poświęconej badaniom własnym na Rysunku 26 zobrazowano kompleks jonów rtęci(II) z ugrupowaniami tyminowymi dowiązanymi do polialliaminy, sugerując pośrednio że reakcje protolityczne polimeru odgrywają rolę w oddziaływaniach opisywanych w rozprawie. Wydaje się, że rozważania te (razem z dyskusją wpływu pH na właściwości tyminy) pomogłyby wyjaśnić różnice w obserwowanej zależności sygnału od zmian logarytmu stężenia analitu dla kropek kwantowych modyfikowanych polialliolaminą podstawioną grupami tyminowymi w różnych pH – Rysunek 48.

Podobnie opisując (znów bardzo zwięźle i ogólnikowo) właściwości chitozanu Autorka napisała: „Ze względu na dużą zawartość ulegających protonowaniu grup aminowych, chitozan charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w roztworach kwasów”, str. 28. Tworzenie dyspersji podobnie jak w przypadku polialliaminy związane jest z protonowaniem polimeru, szkoda że Autorka nie odniosła się do wartości stałych chemicznych charakteryzujących ten proces.

Bardzo proszę o wyjaśnienie w trakcie obrony zdania „Modyfikacja chemiczna chitozanu polegająca na szczepieniu polianiliną prowadzi do poprawy właściwości mechanicznych oraz adhezyjności chitozanu oraz nadaje mu zdolność przewodzenia prądu elektrycznego”, str 29.

Biorąc pod uwagę właściwości polianiliny niezwykle istotne wydaje się doprecyzowanie warunków w jakich można obserwować ewentualne zwiększenie przewodnictwa chitozanu związanego obecnością w kompozycie polianiliny (stosunek obu polimerów, forma polianiliny – zredukowana czy utleniona i w jakim stopniu).

Kolejnym polimerem naturalnym wspomnianym pokrótce w rozprawie jest heparyna. W moim przekonaniu, szczególnie biorąc pod uwagę doświadczenie badawcze i zainteresowania naukowe Promotora i zespołu, w którym Autora realizowała swoje badania, szkoda że opis ten zawężony został tylko do kilku informacji o charakterze raczej popularnonaukowym.

Rozdział 2.2 w rozprawie dotyczy opisu techniki drukowania molekularnego. W krótkim opisie Autorka przedstawiła ogólną ideę otrzymywania polimerów zawierających wnęki odpowiadające wykorzystanym związkom szablony. Również ten rozdział jest lakoniczny i ogólnikowy. Prosiłabym o wyjaśnienie czy termin drukowanie molekularne odnosi się tylko do sieciowania gotowych polimerów po związaniu cząsteczki szablony, czy też możliwe jest budowanie polimeru z monomerów z równoczesnym oddziaływaniem z cząsteczką szablony.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka opisała fotodimeryzację grup tyminowych w polimerach i zastosowanie tego procesu do tworzenia receptorów cząsteczek adeniny i jej pochodnych. Nie jest dla mnie jasne sformułowanie dotyczące polimerów z grupami tyminowymi „ich adsorpcyjne działanie opiera się na fakcie, że pomiędzy cząsteczką tyminy a adeniny powstają dwa wiązania wodorowe, dzięki którym polimery funkcjonalizowane grupami tyminowymi posiadają zdolność kompleksowania adeniny” – kompleksowanie a tworzenie wiązań wodorowych to różne procesy.

Informacje dotyczące fotodimeryzacji tyminy przedstawione na Rysunku 7 wskazują, że proces dimeryzacji tyminy jest odwracalny, jednak efekt ten nie został przedyskutowany w tekście – czy tylko działanie promieniowania o długości fali ok. 250 nm może odwrócić dimeryzację tyminy? Czy inne czynniki chemiczne mogą również wpływać na ten proces?

Kolejny rozdział części literaturowej rozprawy dotyczy „rtęci”, a rozpoczyna go opis właściwości tego pierwiastka. W tym rozdziale, szczególnie biorąc pod uwagę wyniki eksperymentalne przedstawione w dalszej części rozprawy, moim zdaniem bardzo brakuje w pracy informacji o chemii rtęci – szczególnie o chemii jonów rtęci(II) – tworzeniu kompleksów, zależności rozpuszczalności związków rtęci(II) od pH, powiązanej z tymi zagadnieniami toksyczności rtęci(II), rtęci(I) w połączeniach ograniczanych i nieorganicznych. Wydaje się również, iż obecnie istotnym źródłem zanieczyszczenia rtęcią są procesy oczyszczania i

wydobycia złota, że udział tych procesów jest znacznie bardziej istotny niż np. zastosowanie rtęci w stomatologii.

W kolejnym rozdziale; „Charakterystyka kompleksów rtęć – DNA i rtęć – tymina” Autorka przedstawiła ogólne trendy badania oddziaływań jonów metali ciężkich z DNA oraz przedstawiła rys historyczny badań oddziaływań kationów rtęci(II) z tyminą. Recenzentce – jako chemikowi analitykowi – przeszkadza bardzo w tym opisie, ale i w innych miejscach pracy, używanie terminu „rtęć” zamiennie z „jonami rtęci” i niepodawanie stopnia utlenienia. Jak rozumiem intencją Autorki było opisanie przede wszystkim rtęci(II) i jej oddziaływań z DNA czy tyminą (np. „Proces fotosensybilizowanej przez rtęć dimeryzacji tyminy...”, str. 31). Autorka porównuje kompleksy tworzone przez tyminę z jonami rtęci(II) i adeniną pisząc: „Kompleksy THTC są bardziej stabilne niż pary adenina-tymina w DNA...”, str. 30 – myślę że bardziej trafne byłoby odwołanie się do kompleksów tworzonych w tych samych warunkach – tj. oddziaływań tymina – Hg^{2+} - tymina i adenina-tymina (w roztworze, lub w DNA, ale konsekwentnie w tym samym środowisku), i poparcie swojej tezy wartościami odpowiednich stałych charakteryzujących te procesy, jeśli stałe te są dostępne.

W kolejnym podrozdziale Autorka opisuje „Układy sensorowe do oznaczania jonów Hg^{2+} ”, pomijając niezręczność stylistyczną (czym są „układy sensorowe”?), w tej części pracy wymieniono metody analityczne stosowane do oznaczania stężenia rtęci(II) – eksponując przede wszystkim metody fluorymetryczne, a w szczególności wykorzystujące elementy biologiczne do detekcji analitu. Z punktu widzenia analityka takie zestawienie jest trudne do zaakceptowania, ponieważ porównywane metody dotyczą różnych form chemicznych rtęci(II) obecnej w próbce (np. ICP MS i ASV), mają różne podstawy fizykochemiczne – a zatem ogólne (bez szczegółowej dyskusji) porównywanie czułości i selektywności tych metod jest w moim przekonaniu ryzykowne. W tej części rozprawy Autorka wymieniła także szereg metod fluorymetrycznych proponowanych do zastosowania w oznaczaniu stężenia jonów rtęci(II), jednak nie podała zakresów stężeń analitu w jakich mają one zastosowanie. Podanie tych informacji ułatwiłoby ocenę zalet analitycznej fluorymetrycznej metody oznaczania jonów rtęci (II) opisanej przez Autorkę w części doświadczalnej.

W ogólności część literaturowa rozprawy daje pewien pogląd na problematykę poruszaną w pracy, jednak pozostawia też uczucie niedosytu z uwagi na raczej opisowy niż odwołujący się do stałych chemicznych charakter, i mam wrażenie, przypadkowość niektórych podawanych informacji.

Część doświadczalna rozprawy – opis wyników badań własnych Doktorantki została podzielona na trzy zasadnicze rozdziały poświęcone odrębnym zagadnieniom. Każdy z tych rozdziałów zawiera odrębny spis odczynników, aparatury i procedur eksperymentalnych. Układ ten jest w pewnym stopniu uzasadniony tym, że w części rozprawy poświęconej badaniom własnym poruszane są różne zagadnienia, jednak takie ujęcie spowodowało powtarzanie części informacji. W poszczególnych rozdziałach powtarzają się np. informacje o przygotowaniu buforów fosforanowych(V) – pewną niedogodnością z punktu widzenia czytelnika jest konieczność (w pewnych przypadkach) samodzielnego obliczenia stężenia buforu stosowanego w eksperymentach. Szkoda również, że Autorka nie podała czy sprawdzała pH otrzymanych roztworów buforowych – np. w świetle obliczeń roztwór Na_2HPO_4 powinien wykazywać pH bliskie 9,8 a nie 9 (str. 48, 70), a mieszanina roztworów o tym samym stężeniu molowym Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 w stosunku 420 ml do 80 ml powinna wykazywać pH 7,9 a nie 7,7 (str. 81) – tak więc proszę o wyjaśnienie skąd wynikają rozbieżności.

Pierwszy z rozdziałów części poświęconej badaniom własnym dotyczy otrzymywania fotodrukowanych adsorbentów pochodnych adenozy. W części eksperymentalnej tego rozdziału Autorka podaje opis syntez polimerów przeprowadzonych w grupie profesora Shin-ichi Yusa w Japonii, które Doktorantka wykorzystywała w badaniach oraz opis syntezy chitozanu i heparyny podstawionych tyminą. Polimery te były wykorzystywane do modyfikowania powierzchni krzemionki, a następnie sieciowane w obecności cząsteczki szablonowej, wmywanej po procesie sieciowania. Jednak z podanych informacji nie wynika, czy polimery te otrzymała Doktorantka w Japonii, czy też korzystała z polimerów przygotowanych przez osoby trzecie.

W rozdziale tym istotną rolę odgrywało również określanie stężenia pochodnych adeniny w roztworach wykorzystywanych do badań adsorpcji – oznaczane z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Opis metody oznaczenia chromatograficznego jest jednak bardzo lakoniczny. Być może wynika to z faktu, iż w tym zakresie Autorka współpracowała z innymi osobami, czy też korzystała z gotowych procedur opracowanych do innych celów, nie jest to jednak jasne w świetle podanych w rozprawie informacji.

W opisie pomiarów zdolności adsorpcyjnych kilkakrotnie w tekście powtarza się odniesienie do stanu równowagi adsorpcji (str. 57/ 58). Czy rzeczywiście w badanych próbkach ustalał się stan równowagi, czy było to stwierdzone eksperymentalnie czy też przyjęto założenie, iż w danych warunkach stan taki się ustala?

Wyniki badań zmian stężenia badanych pochodnych adeniny przedstawiono na rysunkach i omówiono w tekście. Porównanie danych przedstawionych na rysunkach utrudnia zastosowanie różnej skali na osi rzędnych oraz zmiana kolejności prezentowanych układów na poszczególnych rysunkach, nie mniej jednak widoczne są pewne różnice pomiędzy badanymi polimerami. Przedstawiony opis uzyskanych wyników jest raczej natury jakościowej („...zupełnie nie adsorbuje...”, „...wyraźnie większą zdolnością adsorpcyjną...”) choć wydaje się, że możliwe byłoby wyciągnięcie również pewnych wniosków ilościowych, które podkreśliłyby lepsze zdolności adsorpcyjne polimerów naturalnych (chitozan/ heparyna) modyfikowanych tyminą w porównaniu do polimerów syntetycznych.

Jako recenzenta ciekawi mnie, czy przedstawione wyniki były uzyskane w jednym pomiarze, czy też są średnią wyników kilku pomiarów – a jeśli tak, to jakie były rozrzuty wyników pomiędzy poszczególnymi pomiarami? Czy Autorka prowadziła badania kontrolne dla sfer krzemionkowych niemodyfikowanych polimerami – czy w takim przypadku zachodzi (może niespecyficzna) adsorpcja (np. w porach materiału krzemionkowego)?

Ocena rozdziału dotyczącego porównania selektywności otrzymanych materiałów utrudnia podobnie jak poprzednio styl prezentacji otrzymanych wyników. Jest to szczególnie widoczne np. na Rysunku 19 – gdzie trzy osie rzędnych mają różną skalę od zera do 0,2; 10 i 6. Patrząc na wyniki przedstawione na trzech wykresach na w/w rysunku trudno porównać selektywność opisywanych układów – w moim przekonaniu stwierdzenie „w przypadku wszystkich badanych materiałów niedrukowanych, stwierdzono ich znacznie silniejszą zdolność adsorpcyjną w stosunku do cząsteczek 2'-dA” (str. 64) nie jest uprawomocnione na podstawie przedstawionych danych.

Podobne uwagi dotyczące skali odnoszą się również do Rysunku 20 – dobranie innej skali osi Y na rysunku A (i tak każdy z wykresów ma inny zakres osi rzędnych) pozwoliłoby na lepsze porównanie selektywności. Dodatkowym utrudnieniem w ocenie wyników zaprezentowanych na Rysunkach 21 i 22 jest niezgodność symboli stosowanych w opisie i przedstawionych na rysunkach.

Za istotną wartość naukową tej części rozprawy uważam wykazanie, że mikrocząstki krzemionki modyfikowane fotodrukowanymi polimerami naturalnymi modyfikowanymi, tak aby zawierały grupy tyminowe, charakteryzują się znaczną zdolnością do adsorpcji pochodnych adenozy. Pewien niedosyt pozostawia jednak brak nawet próby przybliżonego wyjaśnienia uzyskanych wyników.

W kolejnym rozdziale Autorka rozprawy badała oddziaływanie jonów rtęci(II) z polimerami syntetycznymi podstawionymi grupami tyminowymi. Do badań wybrano polimer w znacznym stopniu podstawiony grupami tyminowymi, jednak w rozprawie nie znalazłam informacji o tym, jak badano stopień podstawienia grupami tyminowymi.

W tej części rozprawy znaczną część badań prowadzono w roztworach buforu fosforanowego(V) o pH 9 lub wodzie „w obecności jonów Hg^{2+} o stężeniu $c=10^{-4} M$ ”. Jak rozumiem podane stężenie jonów rtęci(II) to stężenie całkowite (inaczej zwane analitycznym), tak więc powstaje pytanie czy w obu badanych roztworach stężenie wolnych jonów rtęci(II) było podobne? Czy oddziaływanie modyfikowanego polimeru z jonami rtęci(II) jest zależne od stężenia całkowitego czy stężenia wolnych jonów rtęci(II)? Jaki jest mechanizm obserwowanego wpływu zmiany wartości pH na reakcję fotodimeryzacji, jaką rolę odgrywać może tutaj protonowanie polialliaminy, a jaką wpływ pH na oddziaływanie jonów rtęci(II) z tyminą, czy zmianę stężenia wolnych jonów rtęci(II) w roztworze. W moim przekonaniu odpowiedź – choćby częściowa na powyższe pytania – pozwoliłaby lepiej docenić niewątpliwie ważne z punktu widzenia naukowe informacje przedstawione w tej części rozprawy. W przedstawionych wynikach zabrakło moim zdaniem również zaprezentowania zmian absorpcji dla naświetlanego polimeru w nieobecności jonów rtęci(II) w próbce.

Podobnie jak w poprzednim rozdziale, pełne docenienie prezentowanych wyników utrudnia pewna niefrasobliwość w ich przedstawianiu – tym razem recenzent ma do czynienia z różnymi skalami na osi X, oceny nie ułatwia również brak informacji o środowisku reakcji w podpisie rysunków, choć informacje te można znaleźć w tekście. W opisie badań wpływu siły jonowej na fotodimeryzację tyminy w obecności jonów rtęci(II) nie znalazłam informacji o pH badanych roztworów.

Przy opisie badań zmiany wielkości średnicy dynamicznej drobin polialliaminy modyfikowanej tyminą w wyniku oddziaływań z jonami rtęci(II) zabrakło moim zdaniem bardzo ważnej informacji o czasie oddziaływań jonów metalu z polimerem.

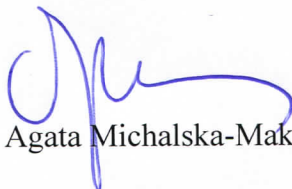
Ostatni rozdział części poświęconej opisowi wyników badań własnych dotyczy wykorzystania kropek kwantowych opłaszczonych polialliaminą modyfikowaną tyminą do oznaczania jonów rtęci(II) w roztworach wodnych. Opracowanie układu, w którym zmiana emisji, przy wzroście intensywności fluorescencji obserwowanym dla wzrostu stężenia analitu, czułego na zmiany stężenia jonów rtęci(II) w niskich stężeniach jest moim zdaniem bardzo istotnym wynikiem uzyskanym w trakcie prowadzenia badań przedstawionych w rozprawie.

Nie mniej jednak jako recenzent chciałam dowiedzieć się w jakich warunkach rejestrowano widma emisji kropek kwantowych przedstawione na Rysunkach 41 i 43 – w tym ostatnim przypadku w nieobecności polimeru – z czego wynikają rozbieżności w położeniu maksimum piku emisji? Czy nieopłaszczony polimerem kropki kwantowe reagowały zmianą emisji na zmianę stężenia rtęci(II) w roztworze, w warunkach analogicznych (pH) jak stosowane dla cząstek opłaszczonych poliialloaminą podstawioną tyminą?

Na Rysunkach 43 i 44 i w poświęconych im fragmentach tekstu zabrakło informacji o pH roztworów w jakich prowadzono opisane badania. Informacja ta wydaje się istotna dla oceny, jakie było stężenie wolnych jonów rtęci(II) w badanych roztworach. Ponadto jak wykazano w dalszej części opisywanego rozdziału, pH roztworu wpływ istotnie na zależność emisji od zmian stężenia jonów rtęci(II). W tej, moim zdaniem bardzo istotnej z naukowego punktu widzenia części rozprawy, zabrakło wyjaśnienia obserwowanego wpływu pH na zależności emisji od zmian stężenia jonów rtęci(II).

Podsumowując część rozprawy poświęconą badaniom własnym należy podkreślić, że Doktorantka wykazała się biegłością w posługiwaniu się różnymi technikami eksperymentalnymi i uzyskała szereg wyników istotnych z punktu naukowego. Wyniki badań własnych ujęte w rozprawie zostały posłużyły do przygotowania dwóch publikacji zamieszczonych w prestiżowych czasopismach. Ponadto wyniki uzyskane w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej posłużyły do przygotowania zgłoszenia patentowego. W moim przekonaniu jest to istotny dorobek biorąc pod uwagę czas, w jakim został osiągnięty i różnorodność realizowanych zagadnień badawczych.

Podsumowując przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska w moim przekonaniu spełnia wszystkie wymagania wynikające z Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki i w związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Gut do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Agata Michalska-Maksymiuk