



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA
Prodzikan ds. Nauki WIMiC

Kraków, 27 sierpnia 2021

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny KOŁODZIEJ
pt. *"Badania nad hybrydowymi membranami i warstwami
wielofunkcyjnymi nanoszonymi na metale i stopy
dla ochrony zdrowia i środowiska"*
zrealizowanej pod kierunkiem
Promotor prof. dr hab. Aleksandry Wseluchy-Birczyńskiej
i Promotor Prof. dr hab. inż. Marty Błażewicz

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Rady Dyscypliny Nauki chemiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz
zlecenia Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki chemiczne Prof.
dr. hab. Artura Michalaka
z dnia 12 lipca 2021

Wiele wskazuje na to, że XXI wiek w przyszłości może być nazwany wiekiem nanotechnologii, gdyż to dzięki zrozumieniu zjawisk zachodzących w skali nanometrycznej oraz dzięki opracowaniu metod badawczych pozwalających na opis świata i oddziaływań w tej skali będziemy – jako ludzkość w szerokim tego słowa rozumieniu – w stanie kształtować nowoczesne materiały i w konsekwencji całe nasze otoczenie. Jeśli dołożymy do tego kolejną – jakże burzliwie rozwijającą się w ostatnich latach dyscyplinę nauki, obejmującą uczenie maszynowe i sztuczną inteligencję, to być może stanie się też możliwe konstruowanie nanomaszyn i nanorobotów. Co prawda nanoroboty, które byłyby w stanie np. zidentyfikować *in situ* komórki nowotworowe u pacjenta oraz je wyleczyć poprzez ingerencję w ich



WIMiC

**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów**

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

materiał genetyczny – są wciąż fikcją naukową, to niewątpliwie w nanotechnologii i nanomateriałach tkwi ogromny potencjał.

Szczególne, unikatowe właściwości posiadają nanoformy węgla takie jak fulereny, nanorurki, grafen oraz nanocząstki magnetyczne. Już obecnie wykorzystuje się je, jako składnik nanokompozytów, nadający im korzystniejsze właściwości mechaniczne, elektryczne, magnetyczne czy termiczne. Ponadto trwają intensywne prace nad wykorzystaniem ich w terapii i diagnostyce medycznej, czym zajmuje się nowa dyscyplina wiedzy, mianowicie nanomedycyna. Z drugiej strony powinniśmy zachować ostrożność w niekontrolowanym uwalnianiu nanocząstek do środowiska, gdyż mogą one ingerować w szlaki metaboliczne w komórkach i nie jest do końca wiadome, jakie długotrwałe skutki uboczne mogą one powodować u ludzi, zwierząt i ogólnie w przyrodzie. Z tego względu konieczne jest opracowanie metod badawczych, które z jednej strony byłyby w stanie charakteryzować strukturę różnych nanomateriałów, a z drugiej pozwalać na ich detekcję i ocenę oddziaływań ze środowiskiem biologicznym.

W kontekście powyższych przesłanek, pani mgr Anna Kołodziej w swojej rozprawie doktorskiej skupiła się na wykorzystaniu techniki spektroskopii ramanowskiej, jako narzędzia służącego do opisu struktury nanoform węgla i nanocząstek magnetycznych a także powłok i nanokompozytów o osnowie polimerowej, wytworzonych z udziałem powyższych nanomateriałów. Ponadto podjęła próbę oceny oddziaływań na granicy faz: nanomateriał/zaadsorbowane białka/zaadherowane komórki, co ma szczególne znaczenie w przypadku zastosowań biomedycznych nanomateriałów.

Tematyka ta budzi duże zainteresowanie na świecie, zarówno w sferze badań podstawowych jak i aplikacyjnych, gdyż mieści się ona w głównym nurcie prac dotyczących nowoczesnych nanomateriałów i ich oddziaływań ze środowiskiem biologicznym. Z tego względu uważam, że wybór tej tematyki jest jak najbardziej właściwy i aktualny.

Praca została zredagowana w języku polskim, ma typowy układ i liczy aż 202 strony. Na początku znajduje się *Streszczenie* w języku polskim i *Abstrakt* w języku angielskim, *Cel pracy* i *Hipoteza badawcza* oraz *Wykaz stosowanych skrótów*. Następnie na 36 stronach jest zawarty *Wstęp teoretyczny*, po czym na kolejnych 20 stronach zostały opisane *Najważniejsze techniki eksperymentalne*, *Preparatyka materiałów* i *Metody pomiarowe*. Najwięcej miejsca (101 stron) zajmuje rozdział *Wyniki i dyskusja*, który został podzielony na 7 podrozdziałów, z których każdy dotyczy innych rodzajów badanych materiałów i systemów. Pracę kończy rozdział zatytułowany *Wnioski* (1 strona) oraz spis literatury składający się z imponującej liczby 235 pozycji literaturowych a także dorobek naukowy doktorantki. Pracę charakteryzuje bardzo dobra proporcja pomiędzy częścią literaturową a doświadczalną.

W dysertacji doktorskiej Pani Anny Kołodziej zarówno cel pracy jak i hipoteza badawcza zostały właściwie sformułowane i nie mam do nich większych zastrzeżeń. Można ewentualnie było napisać, że celem pracy były nie tyle same badania spektroskopowe nanoform węgla i innych nanomateriałów, ale było wykazanie, że spektroskopia ramanowska jest użytecznym narzędziem do opisu struktury tych materiałów, która – jak wiadomo – wpływa na szereg ich właściwości, w tym oddziaływania ze środowiskiem biologicznym. Jednak proszę tę uwagę potraktować, nie jako zarzut merytoryczny, ale ewentualną sugestią dotyczącą formułowania celu kolejnych prac naukowych przez autorkę.

We *Wstępie teoretycznym* doktorantka najpierw dokonała prezentacji stanu wiedzy na temat nanotechnologii, krótko opisując jej genezę oraz wyjaśniła, w czym tkwi przyczyna wyjątkowych właściwości nanomateriałów. Następnie skupiła się na zastosowaniu nanomateriałów w medycynie i ochronie środowiska. W dalszej części opisała nanometryczne struktury węglowe takie jak grafen i tlenek grafenu, ich budowę, sposób otrzymywania, właściwości

i zastosowanie, Kolejno, w podobny sposób, opisała nanorurki węglowe dużo miejsca poświęcając ich funkcjonalizacji i zagadnieniom dotyczącym ich potencjalnej toksyczności a także bardzo ciekawym nanoformom węgla, jakimi są nanowłókna węglowe. Powyższa część pracy została przygotowana w oparciu o najnowsze piśmiennictwo, stanowi więc bardzo wartościowy przegląd najnowszej literatury przedmiotu. Autorka nie ustrzegła się jednak kilku niefortunnych sformułowań, które chcę przytoczyć z obowiązku recenzentki: zamiast pojęcia „plastik” (str. 13) radziłabym w pracach naukowych używać pojęcia „materiał polimerowy” lub „tworzywo sztuczne”, zaś termin „wytrzymałość na pękanie” (str. 18) zastąpić terminem „wytrzymałość” lub „wytrzymałość na rozciąganie”. Mam też wątpliwości, co do terminów „moduł granicy plastyczności i wytrzymałości” użytych na str. 21, czy wyrażenia „ekspotencjalncjalny wzrost liczby publikacji” na str. 22 – pewnie doktorantce chodziło o „wzrost wykładniczy”. Zdaję sobie sprawę, że takie usterki jak: „skala manometryczna” (a nie „nanometryczna”) na str. 26 czy „adsorpcja promieniowania w zakresie podczerwieni” (a nie „absorpcja”) na str. 27 wynikają z włączonej w trakcie redagowania pracy automatycznej funkcji korekty w edytorze tekstu.

W dalszej części *Wstępu teoretycznego* doktorantka opisała nanocząstki magnetyczne skupiając się na ich syntezie i wykorzystaniu w medycynie oraz na polimerach biodegradowalnych pochodzenia naturalnego i syntetycznego w tym na poli(ϵ -kapolaktonie) (PCL). W tym miejscu chciałabym tylko zwrócić uwagę, że PCL otrzymuje się poprzez otwarcie pierścienia a nie łańcucha, jak zostało to podane na str. 42 (na rysunku 7, str. 44, użyto już właściwego terminu „otwarcie pierścienia”).

W rozdziale *Przegląd najważniejszych technik eksperymentalnych* doktorantka przedstawiła opis kwantowy i falowy rozpraszania ramanowskiego a także omówiła mikrospektroskopię ramanowską i dwuwymiarową ramanowską spektroskopię korelacyjną. Chciałabym podkreślić, że omawiany rozdział jest

przykładem bardzo dobrze zredagowanego kompendium wiedzy o nowoczesnych technikach spektroskopii ramanowskiej, które okazały się być szczególnie przydatne w badaniach opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej.

Pomimo kilku uwag o charakterze redakcyjnym i językowym, uważam, że część teoretyczna rozprawy została bardzo dobrze zredagowana, a treści w niej zawarte znajdują pełne uzasadnienie w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej.

W *Części eksperymentalnej* doktorantka skrupulatnie opisała preparatykę próbek i ujęła ją w taki sposób, że możliwe jest powtórzenie opisanych przez nią eksperymentów. Za bardzo udany uważam Rys. 13, na którym zestawiono w sposób syntetyczny wszystkie przygotowane i poddane analizie próbki. Wynika z niego, że doktorantka uzyskała i przebadła ponad 40 różnych rodzajów materiałów, a sam diagram bardzo ułatwia czytelnikowi zorientowanie się, jaki cel przyświecał doktorantce na każdym etapie badań. W dalszej części tego rozdziału oprócz metodologii prowadzenia badań spektroskopowych opisano jak wykonywane były badania za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej, mikroskopii fluorescencyjnej, dyfraktometrii rentgenowskiej, zwilżalności i energii powierzchniowej, profilometrii i testu zarysowania.

W rozdziale 7 *Wyniki i dyskusja* doktorantka dokonała analizy struktury różnych rodzajów nanomateriałów, głównie węglowych za pomocą wielu technik badawczych, jednak zawsze najwięcej miejsca poświęcała technikom spektroskopii ramanowskiej.

W podrozdziale 7.1 autorka scharakteryzowała strukturę nanododatków węglowych, które w dalszej części pracy wykorzystywała do wytwarzania nanokompozytów i nanoszenia powłok na metale. Analiza widm w oparciu o zjawisko dyspersji fononów i podwójnego rezonansu Ramana w warstwach grafenu pozwoliła autorce na oszacowanie czy dane struktury są amorficzne czy krystaliczne oraz w jakim stopniu są zdefektowane. Badania

wykazały, że najwyższym stopniem uporządkowania charakteryzuje się zredukowany tlenek grafenu, zaś najmniej uporządkowane są nanowłókna węglowe. Przeprowadzone badania wykazały również, że rodzaj użytego lasera – a więc jego energia i długość fali – mają istotny wpływ na położenie, intensywność i szerokości połowkowe pasm w widmach ramanowskich a także na parametry opisujące stopień nieuporządkowania struktury, czy wielkość krystalitów. Zastanawiające jest, że obliczone wielkości krystalitów L_a (Tabela 4 na str. 97) różniły się diametralnie między sobą dla tej samej próbki i rosły wraz ze wzrostem długości fali lasera (spadkiem energii). Tu nasuwają mi się pytanie: Czy można byłoby zastosować inną technikę badawczą by zweryfikować uzyskane wyniki? Który laser doktorantka rekomendowałaby do badań nanomateriałów węglowych?

W podrozdziale 7.2 doktorantka zebrała wyniki badań nad nanokompozytami węglowymi o osnowie z PCL, do których najpierw wprowadzała tlenek grafenu i zredukowany tlenek grafenu. Badania wykazały, że tlenek grafenu oddziałuje z łańcuchami polimerowymi w większym stopniu niż zredukowany tlenek grafenu i pełni dodatkowo rolę zarodków krystalizacyjnych. W konsekwencji możliwe jest sterowanie właściwościami nanokompozytów poprzez odpowiedni dobór modyfikatora.

Następnie autorka przedstawiła wyniki badań kompozytów o osnowie z PCL z wielościennymi nanorurkami węglowymi oraz z nanorurkami, które zostały dodatkowo sfunkcjonalizowane poprzez obróbkę oksydacyjną. W tym przypadku wykazano, że zmodyfikowane nanorurki, dzięki obecności na swojej powierzchni tlenowych grup funkcyjnych w mniejszym stopniu zaburzały tworzenie się sferolitów polimerowych, niż nanorurki niezmodyfikowane, które wykazywały za to tendencję do aglomeracji. Poziom krystaliczności osnowy PCL oszacowany za pomocą badań spektroskopowych znalazł swoje potwierdzenie w obserwacjach mikroskopowych.

Na końcu rozdziału 7.2 doktorantka przedstawiła podobny zakres badań, ale odnoszący się do kompozytów PCL z nanowłóknami

węglowymi niemodyfikowanymi oraz po obróbce utleniającej. Wnioski z tej części pracy są spójne z wnioskami z badań nad nanokompozytami z nanorurkami węglowymi, przy czym spadek krystaliczności osnowy był również widoczny w przypadku nanowłókien niemodyfikowanych. Czy zdaniem doktorantki badania za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), mogłyby dodatkowo potwierdzić wysnuwane przez nią wnioski odnośnie krystaliczności nanokompozytów PCL z nanorurkami czy nanowłóknami węglowymi?

W rozdziale 7.3 autorka zastosowała oryginalne podejście do badania aktywności biologicznej opracowanych przez nią kompozytów z modelowymi komórkami kostnymi U-2OS, które wykazują ekspresję białka zielonej fluorescencji. W celu oceny oddziaływania komórek z powierzchnią nanokompozytów wykorzystwała dwuwymiarową ramanowską spektroskopię korelacyjną (2D-COS). Metoda ta dostarczyła niepodważalnych danych, zweryfikowanych poprzez badania za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, że ani czysta matryca PCL ani kompozyt PCL/zredukowany tlenek grafenu nie sprzyjają adhezji i proliferacji komórek. W obu tych przypadkach nie stwierdzono, albo stwierdzono tylko niewielkie oddziaływania korelacyjne pomiędzy pasmami ramanowskimi pochodzącymi od komórek, matrycy i nanododatku. Lepszymi właściwościami, jako podłoże do hodowli komórek wykazał się nanokompozyt PCL/tlenek grafenu, chociaż największe oddziaływania komórek wystąpiły z kompozytami zawierającymi nanorurki węglowe. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że to właśnie kompozyty zawierające natywne i sfunkcjonalizowane nanorurki węglowe okazały się być bardzo dobrym podłożem sprzyjającym adhezji i proliferacji komórek. Metoda 2D-COS pozwoliła nie tylko na potwierdzenie wyników badań biologicznych, ale też wykazała, że w większym stopniu taki kompozyt (a w zasadzie matryca polimerowa zmodyfikowana poprzez dodatek sfunkcjonalizowanych nanorurek) oddziałuje z komórkami niż kompozyt z nanorurkami niemodyfikowanymi, co dodatkowo powiązано z krystalicznością matrycy w kompozycie. W dalszej części

pracy przedstawiono podobny zestaw badań dla kompozytów z nanowłóknami węglowymi, uzyskując również zadowalające wyniki badań biologicznych.

W podrozdziale 7.4 opisano wyniki dotyczące nanocząstek magnetycznych bez modyfikacji oraz zmodyfikowanych różną ilością kwasu oleinowego oraz nanokompozyty o osnowie PCL zawierające zmodyfikowane nanocząstki magnetyczne. Chociaż badania za pomocą samej mikrospektroskopii ramanowskiej nie wskazywały na istnienie oddziaływań pomiędzy zmodyfikowanymi nanocząstkami magnetycznymi a osnową PCL, to dopiero 2D-COS okazała się być właściwą metodą wskazującą z jednej strony na oddziaływania pomiędzy rdzeniem nanocząstki a powłoką z kwasu oleinowego, oraz kwasu oleinowego a matrycą PCL.

Tak więc kolejny raz technika 2D-COS okazała się być przydatną metodą do oceny oddziaływań międzyfazowych.

Podrozdział 7.5 stanowi kolejny przykład ciekawych badań nad węglowymi materiałami dla medycyny, w których zostały wykorzystane włókna węglowe modyfikowane nanokrzemionką i fosforanami wapnia. Ostatni podrozdział 7.6 dotyczy analizy warstw węglowych nanoszonych metodą elektroforetyczną na płytkach metalowych i modyfikowanych metodą biomimetyczną poprzez osadzanie fosforanów wapnia z SBF oraz adsorpcję albuminy.

W obu tych eksperymentach zastosowano spektroskopię ramanowską, która okazała się być przydatna do opisu struktury włókien węglowych i warstw węglowo-ceramiczno-białkowych na podłożach metalowych.

Pracę kończy rozdział 8. *Wnioski* (1 strona), który bardzo dobrze podsumowuje wyniki przeprowadzonych eksperymentów i wskazuje, że doktorantka potrafiła w sposób syntetyczny spojrzeć na uzyskane przez siebie rezultaty, co również świadczy o jej dojrzałości naukowej.

Pozycje literaturowe zostały dobrane w adekwatny sposób i obejmują również prace, których doktorantka jest współautorką.

Zauważyłam tylko błąd w cytowaniu pozycji [232], w której – pewnie przez przypadek – usunięto nazwisko ostatniej współautorki i nazwę czasopisma. Jest to o tyle ważne, że dotyczy to pracy, w której doktorantka jest pierwszą autorką i ten sam błąd pojawia się również w rozdziale 10. *Dorobek naukowy*.

Chciałabym podkreślić, że jestem pod wrażeniem liczby przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych wyników a także ich dogłębnej interpretacji. Oprócz wymienionych pewnych niedociągnięć natury edytorskiej nie mam uwag krytycznych dotyczących strony merytorycznej recenzowanej pracy a pytania zawarte w recenzji są zaproszeniem doktorantki do dyskusji naukowej.

Na podkreślenie zasługuje też, że kandydatka do stopnia doktora jest współautorką aż ośmiu artykułów opublikowanych w czasopiśmie z bazy JCR, które są powiązane tematycznie z jej dysertacją, przy czym w sześciu z nich jest pierwszą autorką. Ponadto doktorantka pięciokrotnie prezentowała wyniki swoich badań na konferencjach naukowych, trzy razy wygłaszając referaty i dwa razy prezentując postery. Jej prezentacja na *10th International Symposium on Two-dimensional Correlation Spectroscopy* w Changchun, w Chinach, 19-21.08.2021, uhonorowana została nagrodą „*Best Poster Award*”. Nie ulega żadnej wątpliwości, że zarówno zakres prowadzonych badań i osiągnięte wymierne efekty świadczą, że dorobek pani mgr Anny Kołodziej wykazuje, że jest ona wyróżniającym się młodym badaczem.

Uważam, że praca pani mgr Anny Kołodziej pt. *“Badania nad hybrydowymi membranami i warstwami wielofunkcyjnymi nanoszonymi na metale i stopy dla ochrony zdrowia i środowiska”* w pełni spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie nauki chemiczne określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789)

oraz art.179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). Wnoszę więc o jej przyjęcie oraz dopuszczenie pani mgr Anny Kołodziej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Za największe osiągnięcia Doktorantki uważam:

1) opracowanie sposobu otrzymywania całego spektrum nanomateriałów węglowych i magnetycznych oraz wytworzenie z nich nanokompozytów o osnowie polimerowej a także użycie ich do modyfikacji powierzchni materiałów metalowych,

2) scharakteryzowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych materiałów za pomocą różnych metod badawczych, oraz

3) wykazanie, spektroskopia ramanowska a w szczególności dwuwymiarowa spektroskopia korelacyjna są doskonałymi narzędziami do opisu oddziaływań pomiędzy nanocząstkami, matrycą polimerową a otoczeniem biologicznym, w tym komórkami.

Na podkreślenie zasługuje, że przedstawione w dysertacji doktorskiej wyniki badań oraz ich interpretacja zostały już opublikowane w bardzo dobrych czasopismach i przeszły wnikliwy proces recenzji. Doktorantka w swoich pracach oprócz metod spektroskopowych stosuje inne techniki badawcze używane nie tylko w naukach chemicznych, ale i w inżynierii materiałowej czy biologii.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że praca doktorska pani mgr Anny Kołodziej w pełni zasługuje na wyróżnienie.

