

Profesor Edward Szłyk  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 30.08.2016r.

Wydział Chemii  
ul. Gagarina 7  
87 100 Toruń

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Regiel-Futyra**  
**“Synthesis, physicochemical characterization and biological activity of compounds**  
**based on biocompatible polymers and metal/metal oxides nanoparticles”**  
**wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego**  
**Promotor: Profesor Grażyna Stochel**

Naukowe zagadnienia rozprawy obejmują obszar: chemii, biochemii i chemii materiałowej, zaś koncentruje się ona na poszukiwaniu nowych kompozytów aktywnych biologicznie. Autorka podjęła się otrzymania kompozytów zawierających nanocząstki (NPs) oraz biopolimery. Jako biopolimery wybrane zostały chitozan (CS) i alkohol poliwinylowy (PVA), które są biokompatybilne i degradowalne, a w połączeniu z nanocząstkami metali (Ag, Au), lub tlenków (ZnO, TiO<sub>2</sub>) mogą tworzyć materiały hybrydowe. Potencjalne zastosowanie tych kompozytów może polegać na wytwarzaniu nowych leków lub opatrunków wykazujących aktywność antygrzybiczą i antybakteryjną bądź cytotoksyczną, szczególnie w przypadku zjawiska lekooporności szczepów bakteryjnych i grzybów posiadających zmieniony mechanizm obronny. Tak zdefiniowana tematyka rozprawy stanowi atrakcyjny temat naukowy o dużym ładunku poznawczym ważnym dla nauk chemicznych i biomedycznych, więc o wyraźnie interdyscyplinarnym charakterze, co uważam za zaletę tej pracy doktorskiej. Ponadto tematyka rozprawy wnosi nowe możliwości rozwoju metod wytwarzania nanomateriałów nieorganiczno-polimerowych.

Praca jest opisana na 203 stronach, zawiera 406 pozycji literaturowych, spis publikacji, patentów i komunikatów konferencyjnych Autorki oraz streszczenie w j. polskim i suplement eksperymentalny dotyczący szczegółowych badań ilościowych, mechanicznych i cytotoksycznych kompozytów CS-Ag, czyli w sumie 243 strony, tym samym jest to najobszerniejsza praca doktorska, którą miałem przyjemność oceniać. Układ pracy jest klasyczny dla rozpraw doktorskich: wprowadzenie, część literaturowa, cele pracy, część eksperymentalna i podsumowanie z literaturą. Mimo tak dużej objętości muszę stwierdzić, że

w pracy nie ma zbędnego materiału, zaś szeroki zakres badań eksperymentalnych wymagał stosownego opisu.

Doktorantka w części literaturowej rozprawy przeprowadziła analizę stanu badań w obszarze kompozytów nanometali i nanotlenków z biopolimerami. Przedstawiła zasady wytwarzania nanocząstek metali oraz ich właściwości optyczne. Następnie omówiła właściwości fizykochemiczne i antymikrobowe chitozanu oraz alkoholu poliwinylowego w funkcji masy cząsteczkowej. Podobnie przedstawiono charakterystykę AgNPs i AuNPs w nawiązaniu do potencjału mikrobiotycznego nanocząstek. Dalej następuje opis właściwości kompozytów tlenków metali z polimerami w procesach fotokatalitycznych z udziałem tlenku tytanu(IV) i cynku jako półprzewodników. Kolejny rozdział dotyczy procesów fotokatalitycznych w połączeniu z mechanizmami biologicznymi oraz stresem oksydacyjnym i zjawiskiem występowania reaktywnych form tlenu (ROS). Następnie wytłumaczyła zasady zmniejszania negatywnych efektów działania półprzewodników na tkankę człowieka, podkreślając możliwość tworzenia biokompatybilnych polimerów na przykładzie kompozytu tlenku cynku z chitozaniem na różnych nośnikach (membrany, bawełna, poliuretany).

Analiza danych literaturowych pozwoliła Autorce na sformułowanie celu naukowego rozprawy, który najogólniej pokrywa się z tytułem rozprawy. Hipoteza naukowa zawarta jest w założeniu o możliwości wytworzenia układu posiadającego właściwości antymikrobiotyczne i jednocześnie blokującego promieniowanie nadfioletowe. Koncepcja prowadzenia badań wyróżnia się tym, że obejmuje obszar chemii nieorganicznej, materiałowej i badań biologicznych z wyraźnie określonymi celami aplikacyjnymi w medycynie i kosmetyce, zaś cele naukowe są ważne dla badań chemicznych (synteza nanocząstek), biologicznych (cytotoksyczność) oraz materiałowych wytwarzanie i charakterystyka kompozytów polimer biodegradowalny – nanocząstki, czyli jest to zakres badań znacznie przekraczający wymagania i praktykę realizacji rozpraw doktorskich.

W celu weryfikacji hipotez naukowych w części doświadczalnej (na 158 stronach) zaczynającej się od rozdziału zatytułowanego „Materiały i metody” Autorka opisała syntezę nanocząstek metali (Ag i Au) w obecności CS i PVA oraz modyfikacji powierzchni cząstek tlenków metali (Ti, Zn) przy pomocy chitozanu. Do badania otrzymanych kompozytów zastosowała następujące metody instrumentalne: spektrofotometria, oznaczania metali ICP MS i ICP OES (*uwaga s.52 neutralized with nitric acid lepiej byłoby mineralized by ...*), pomiar średnicy hydrodynamicznej, potencjału zeta, kąta zwilżania, widma IR powierzchni, mikroskopii - TEM, SEM – EDS, spektrometrii XPS, pomiary uwalniania srebra z nanokompozytów, TGA, DRS, pomiary wytrzymałości na zrywanie oraz XRD, - czyli

zastosowała aż 15 metod instrumentalnych, które dały pełną charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych kompozytów. Konieczne pomiary aktywności foto-elektrochemicznej i fotokatalitycznej kompozytów Autorka wykonała metodami woltamperometrycznymi i spektrofotometrycznymi w stosunku do modeli chemicznych takich jak: Azuryna B,  $\alpha$ -terpinen (*pytanie - czy sprawdzono fotoutlenianie roztworu ślepego?; uwaga podpisy do fig. 4, 6, 7 itd. W pracy użyto „structure of chlorofenol” to są wzory strukturalne*), 4-chlorofenol i kwas tereftalowy. Natomiast oddziaływanie BSA i HSA z nanocząstkami półprzewodników w obecności promieniowania UV w tym badania degradacji białek na żelu poliakrylamidowym przez dodatek detergentu SDS analizowano metodami elektroforezy żelowej, zaś pomiar zjawiska generowania tlenu singletowego wykonano techniką fosforescencji w zakresie NIR. Planowane badania cytotoksyczności *in vitro* wykonano dla kompozytów: CS-Ag; CS-Au; ZnO/TiO<sub>2</sub> i CS@ZnO/CS@TiO<sub>2</sub> stosując 3 linie komórkowe raka CT26, A549, i HaCaT, zaś w celu oceny wpływu kompozytów CS-Ag, -ZnO lub CS@ZnO i -TiO<sub>2</sub> na morfologię komórek zastosowano pomiary fluorescencji oraz SEM, natomiast aktywność antybakteryjną i antygrzybiczą sprawdzono testem ASTM E2 180-07. W tej części zauważyłem: *błąd nagłówka w tab. 4/s.46, i tab. 6/s. 48/ sodium borohydride--- powinno być tetrahydridoborate; pytanie do metodyki; Neutralizacja filmów za pomocą NaOH- jak sprawdzono neutralizację roztworu*). Zastosowane metody są dobrane i opisane prawidłowo, skąd wynika wniosek o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym i eksperymentalnym Autorki do przeprowadzenia badań wymaganych do osiągnięcia celów rozprawy.

Wyniki badań i ich dyskusję Autorka przedstawiła na ok. 120 stronach dysertacji zakończonych podsumowaniem i wnioskami oraz przedstawieniem perspektywy dalszych badań. Dyskusję wyników badań Kandydatka rozpoczęła od kompozytów CS-AgNP, która została zawarta na 45 stronach. W kolejnych rozdziałach Autorka omówiła wyniki analiz przeprowadzonych wyżej wymienionymi metodami badań nanocząstek i kompozytów, porównała oraz przedyskutowała w odniesieniu do danych literaturowych, zaś wnioski z tej części zawarła w podsumowaniu na str. 116-117, stosując ten sposób w następnych rozdziałach, co jest bardzo dobrym rozwiązaniem przy ocenie wyników rozprawy. Najważniejsze merytorycznie wyniki dla kompozytów Cs-AgNP to: nanocząstki są: sferyczne, monodispersyjne, o średnicy pon. 10 nm i rozłożone regularnie w filmie chitozanu. Spośród badanych próbek nanokompozyty z chitozanem o średniej masie cząsteczkowej wykazały bardzo dobrą aktywność antybakteryjną w stosunku do 3 szczepów bakterii oraz antygrzybiczą, natomiast testy cytotoksyczności *in vitro* w przypadku 3 linii

komórkowych raka potwierdziły ich silną aktywność w środowisku bez białka serum i słabą aktywność w obecności białka oraz znaczny spadek cytotoksyczności w przypadku drugiego ekstraktu. Wykonane bardzo szerokie i właściwie zinterpretowane badania wskazują na umiejętność planowania i realizacji badań naukowych przez Kandydatkę, właściwą interpretację wyników i weryfikację hipotez naukowych, czyli wymagań stawianych przez ustawę do uzyskania stopnia naukowego doktora.

*Analizując rozdział dotyczący pomiarów XPS dla kompozytów CS-AgNP powstaje pytanie: na rys 19 podano rozszczepione piki przy 368,7 i 367,9 eV i są one przedstawione jako wyraźne piki gaussowskie, jednakże z ich położenia wynika, że duże ich powierzchnie pokrywają się. Powstaje pytanie czy są one wynikiem rozkładu geometrycznego piku 368 eV czy też wykonano 2 różne widma aby je wyodrębnić. Również powstaje problem obliczenia wielkości przesunięcia chemicznego XPS w dyskusji o powstaniu  $Ag_2O$ , ponieważ nie podano dokładnej energii piku przy niższej rozdzielczości. Rozdzielczość aparatu XPS wynosi przynajmniej 0.01%, więc czy przesunięcie nie jest powyżej zdolności rozdzielczej aparatu? Czy znane są wzorcowe widma XPS dla  $Ag_2O$ ?*

Drugi duży rozdział poświęcony nanokompozytom CS-AuNPs, podobnie jak dla AgNPs, opisuje syntezę nanocząstek złota oraz kompozytów z CS oraz ich analizę identycznymi metodami. Podsumowanie właściwości bakteriobójczych CS-AuNPs jednoznacznie wskazało na najsilniejsze działanie kompozytu o największej zawartości złota w stosunku do 3 szczepów bakterii. Analizując wyniki cytotoksyczności CS-AuNPs, dla identycznych linii raka jak dla srebra, Autorka stwierdziła zależność aktywności CS- AuNPs od linii rakowej (dla HaCaT były aktywne), co potwierdziły obrazy morfologii (TEM). Wyniki tej części badań zostały zinterpretowane prawidłowo. Następne dwa rozdziały poświęcone analizie kompozytów alkohol poliwinylowy - srebro (PVA-Ag i PVA/Cs- Ag) oraz identycznych kompozytów złota, które opisano w podobny sposób jak poprzednie. (s.155 *błąd tytułu rozdziału 5.4 i 5.4.2 PVA –Ag?; widmo IR str. 147 shifted to a higher wavenumbers from 3370 to 3280?*)

W podsumowaniu Autorka zauważyła istotne różnice pomiędzy kompozytami z chitozaniem a PVA i słusznie postuluje wykorzystanie mechanicznych zalet w przyszłych badaniach nad polepszeniem ich aktywności antybakteryjnej lub cytotoksyczności. Następny rozdział dotyczył identycznych badań z nanocząstkami złota i prawidłowo opracowane wyniki dają podobne wnioski jak dla srebra. Dalsze rozdziały opisują kompozyty chitozanu z ZnO i  $TiO_2$ , które wskazują na zanik właściwości fotokatalitycznych Cs-ZnO, brak generowania tlenu singletowego i fotodegradacji BSA, oraz na działanie antybakteryjne w stosunku do

wybranych szczepów bakterii, tudzież brak cytotoxyczności w stosunku do keratynocytów skóry. Sugeruje to duże możliwości aplikacyjne kompozytów ZnO z chitozanem w kosmetyce i podobne właściwości wykazały kompozyty CS@TiO<sub>2</sub>.

Ostatni rozdział rozprawy zatytułowany wnioski i perspektywy (8 stron), pełni rolę szerszego podsumowania. Większość zebranych w nim najcenniejszych wniosków wymieniałem powyżej, zaś z nowych istotnych należy podać:

a) mechanizm działania antybakteryjnego Ag<sup>+</sup> w CS-Ag na powierzchni ściany komórki (schemat 12) i powiązania go z zanikiem właściwości cytotoxycznych w stosunku do linii rakowych. Autorka zauważyła, że filmy CS-Ag posiadają silne właściwości antybakteryjne na styku filmu, zaś brak wydzielania Ag do roztworu ogranicza ich właściwości cytotoxyczne. Podobne wnioski dotyczą kompozytów CS-Au, za wyjątkiem braku efektu antygrzybicznego, ale cytotoxyczność jest większa niż w kontakcie ze srebrem. Mechanizm działania biologicznego złota Autorka także powiązała z procesem zamknięcia metalu w otoczce biokompatybilnego polimeru.

b) Najważniejsze wnioski dotyczące nanokompozytów z ZnO i TiO<sub>2</sub> dotyczą zaniku efektu fotokatalitycznego w stosunku do czystego tlenku cynku oraz znaczne ograniczenie tego zjawiska w kompozycie z ditlenkiem tytanu. Ważną cechą aplikacyjną kompozytów jest redukcja tworzenia ROS i możliwe zastosowanie w ochronie skóry przed promieniowaniem UV słońca.

Wymienione powyżej wnioski i obserwacje mają charakter nowości naukowej, co potwierdza dużą wartość poznawczą rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że Pani mgr Anna Regiel-Futyrą posiada wiedzę z dziedziny chemii nieorganicznej, bionieorganicznej, metod spektroskopowych, mikroskopowej analizy powierzchni i elektrochemii, więc spełnia wymagania do nadania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Przedstawione powyżej wnioski pozwalają na stwierdzenie, że recenzowana rozprawa doktorska z nadmiarem spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym (Dz.U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Regiel-Futyrą do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie pragnę zasugerować Radzie Wydziału Chemii UJ wyróżnienie **rozprawy** za uzyskane cenne wyniki, zawierające wiele elementów nowości naukowej (wymienione powyżej i potwierdzone publikacjami), jej szeroki zakres tematyczny, zastosowanie i znajomość wielu metod badawczych oraz bardzo dobrze przeprowadzoną dyskusję wyników,

a także staranną redakcją rozprawy. Wyjątkowość dzieła ponad przyjętą poprawność w swojej dziedzinie polega na:

- a) znacznie przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim poprzez: badania fizykochemiczne nanokompozytów i korelację z aktywnością antybakteryjną, cytotoksyczną, antygrzybiczą, obrazowanie komórki i mechanizmów biologicznej aktywności nanokompozytów,
- b) praca jest czytelna i kompletna, ponieważ założenia i cele zostały w pełni opisane i zrealizowane. Poziom naukowy wyników jest światowej klasy w tej dziedzinie i przyczyni się do opracowania na poziomie *in vitro* nowych rozwiązań farmakologicznych dla medycyny i kosmetyków bądź zwalczania i diagnostyki chorób nowotworowych,
- c) perspektywiczne znaczenie badań wynika z rozwoju nowych materiałów o dedykowanym przeznaczeniu (antybakteryjne i nieaktywne cytotoksycznie) oraz nowych kompozytów do badań *in vivo*,
- d) wszystkie zastosowane metody chemiczne, fizyczne i biologiczne należy zakwalifikować do nowoczesnych i odpowiednio dobranych oraz zinterpretowanych. Szczególną jakość mają badania zachowania nanokompozytów wobec komórek nowotworowych. Badania dotyczące zastosowań nanokompozytów w kosmetyce łączą dane o strukturze i właściwościach oraz ich wpływie na przebieg procesów życiowych organizmu.
- e) Oddziaływanie dzieła na naukę przejawia się wysoką już liczbą cytowań dla 5 prac, od 2013 roku wynoszącą 54/51 cytowań, a indeks  $h=3$  (Scopus 30.08.2016).
- f) Upowszechnienie wyników pracy w postaci 5 publikacji w światowej rangi czasopismach z zakresu chemii materiałowej i dalsze 2 publikacje w 2016 roku oraz 28 prezentacji konferencyjnych wskazują na ważność wyników i duży wysiłek Autorki w rozpowszechnianiu rezultatów dzieła. W dorobku Autorki znajdują się także 2 patenty, na nowe kompozyty tlenku cynku, co uwydatnia wartość aplikacyjną pracy i wyjątkowe osiągnięcia doktorantki.

  
Edward Szłyk