



Toruń, 15 grudnia 2022 r.

dr hab. Katarzyna Lewandowska, prof. UMK

Katedra Chemii Biomateriałów i Kosmetyków

email: reol@umk.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Agaty Ładniak

z tytułu

Charakterystyka oddziaływań TiO_2 /biopolimer w układzie dyspersyjnym i na podłożu stałym w aspekcie biokompatybilności

Podstawą recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Ładniak było pismo Dyrektora Instytutu Nauk Chemicznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Pani prof. dr hab. Małgorzaty Grabarczyk z dn. 25.10.2022 r. z prośbą o opracowanie recenzji pracy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Agaty Ładniak została wykonana w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych, w Instytucie Nauk Chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Wiącek, prof. UMCS. Promotorem pomocniczym rozprawy była Pani dr hab. Małgorzata Jurak, prof. UMCS.

Poszukiwanie i projektowanie nowych, funkcjonalnych, materiałów polimerowych opartych na polimerach naturalnych do potencjalnych zastosowań w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym czy medycynie są istotnym obszarem badań naukowych i prac rozwojowych prowadzonych na całym świecie. Choroby cywilizacyjne i starzejące się społeczeństwo zwłaszcza w krajach rozwiniętych, są powodem dynamicznego rozwoju medycyny regeneracyjnej, w której pokłada się duże nadzieje związane z leczeniem chorób cywilizacyjnych i w efekcie wydłużeniem i poprawą komfortu życia osób przewlekle chorych. Szczególną uwagę poświęca się opracowaniu i dokładnemu przebadaniu nowych materiałów bioinspirowanych i



biomimetycznych, które mogą być wykorzystane w inżynierii tkankowej, w systemach dostarczania leków i innych substancji aktywnych, nowej generacji materiałach opatrunkowych, czy preparatach kosmetycznych. W ten trend dobrze wpisuje się, praca doktorska mgr Agaty Ładniak. Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Agaty Ładniak było otrzymanie innowacyjnych biomateriałów na bazie chitozanu, kwasu hialuronowego i tlenku tytanu (IV), które mogą wykazywać właściwości fizykochemiczne i biologiczne w tym przeciwbakteryjne odpowiednie do zastosowań w aplikacjach biomedycznych czy farmaceutycznych. W przeprowadzonych badaniach uzyskano i porównano właściwości dyspersji wodnych w następujących układach:

- ⊙ jednoskładnikowym – dyspersja tylko tlenku tytanu (IV),
- ⊙ dwuskładnikowych – dyspersje zawierające tlenek tytanu i chitozan w szerokim zakresie pH (3-9)
- ⊙ trójskładnikowych – dyspersja zawierająca tlenek tytanu (IV), chitozan i kwas hialuronowy

Układy zawierające tlenek tytanu (IV) i chitozan czy kwas hialuronowy są już częściowo opisane i scharakteryzowane w literaturze. Nowością naukową proponowanej pracy były kompleksowe badania fizykochemiczne powierzchni filmów związane ze ich stabilnością i biokompatybilnością otrzymanych kompozytów trójskładnikowych w formie dyspersji, a także na podłożu stałym odpowiednio wcześniej zmodyfikowanym oraz porównanie tych układów z kompozytami dwuskładnikowymi. W kolejnym etapie badań dokonano oceny biokompatybilności zaprojektowanych i zbadanych wcześniej układów kompozytowych wobec modelowych błon biologicznych z zastosowaniem dwóch wybranych fosfolipidów. W ostatnim etapie zbadano aktywność przeciwbakteryjną uzyskanych materiałów w odniesieniu do dwóch typów bakterii Gram-ujemnych pałeczek okrężnicy (*Escherichia coli*) i Gram-dodatnich bakterii gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Dodatkowym efektem prowadzonych badań przez Doktorantkę było poszerzenie wiedzy na temat oddziaływań układów kompozytowych zawierających naturalne polielektrolity z błonami biologicznymi.



Rozprawę doktorską przygotowano w oparciu o dwanaście artykułów naukowych opublikowanych w specjalistycznych, prestiżowych czasopismach o sumarycznym wskaźniku cytowań (Impact Factor) IF = 45,631 oraz łącznej liczbie punktów ministerialnych 826 zgodnie z rokiem opublikowania. Jedenaście z tych prac jest indeksowanych w bazach Web of Science i Scopus. Wszystkie artykuły są ściśle ze sobą powiązane tematycznie i stanowią spójny cykl publikacji opublikowanych w latach 2017 – 2022. Warto podkreślić, że niektóre z tych prac opublikowane z udziałem Doktorantki są dobrze cytowane tj. w *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **2018** – 37 cytowań; w *Materials Science and Engineering C*, **2018** - 14 cytowań; *Adsorption*, **2019** - 13 cytowań; *Advances in Colloid and Interface Science*, **2021** – 31 cytowań i w *Molecules*, **2022** - 4 cytowania. Łączna liczba cytowań (bez autocytowań) dla prac indeksowanych w bazie Scopus, to 109 cytowań na dzień 7 grudnia 2022 r., co jest bardzo dobrym wynikiem. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantki oraz współautorów udział Doktorantki wynosił w poszczególnych pracach: 100% w jednej (D4), 60% w jednej (D3), 50% w siedmiu (D1, D5-D8, D10, D12), zaś w trzech pracach w zakresie 10% - 40%. W 10 publikacjach (D1, D3-D8, D10-D12) Pani mgr A. Ładniak jest pierwszym autorem, w jednej drugim autorem, zaś w ośmiu z nich autorem do korespondencji (D4-D8, D10-D12). **Zatem, mogę stwierdzić, że Pani mgr Agata Ładniak miała wiodący udział w publikacjach cyklu stanowiącego podstawę przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej oraz, że prace te zostały opublikowane w bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.**

Pani mgr A. Ładniak posiada bardzo dobry dorobek naukowy – opublikowała dotąd 15 artykułów w czasopismach z Listy Filadelfijskiej w latach 2017-2022, jeden w recenzowanym czasopiśmie z poza listy, a także 9 rozdziałów w recenzowanych monografiach naukowych. Wyniki swoich badań prezentowała na 31 konferencjach naukowych krajowych i międzynarodowych podczas, których była autorem i współautorem 37 wystąpień ustnych oraz 28 wystąpień posterowych. Pani mgr A Ładniak jest obecnie kierownikiem grantu **Preludium – 20**, była kierownikiem grantu „Grant dla młodych naukowców” przyznany w ramach konkursu m.in. uczestnikom studiów doktoranckich na Wydziale Chemii UMCS. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej nawiązała współpracę z dr hab. Martą Palusińską-Szys, prof. UMCS z



Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS, a także z dr. Robertem Mroczką z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu oraz współpracowała z dwiema firmami: *JAR* i *CooperVision Manufacturing Limited*. Doktorantka otrzymała, także trzy nagrody zespołowe Rektora UMCS, nagrodę zespołową Rektora UMCS za wysoko punktowaną publikację, stypendium Rektora UMCS dla najlepszych doktorantów, stypendium Prezydenta Miasta Lublina dla uczestników studiów doktoranckich, a także dyplom za najlepsze wystąpienie ustne wygłoszone na konferencji „Fizykochemia granic faz – metody instrumentalne” w Lublinie.

Praca doktorska jest złożona z 93-stronicowego opracowania, w którym Doktorantka przedstawiła uzasadnienie wyboru tematu (3 strony), wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (3 strony), główny cel pracy oraz dziewięć cząstkowych hipotez badawczych (2 strony). Cel badań i szczegółowe hipotezy są jasno sformułowane i konsekwentnie realizowane w badaniach eksperymentalnych. Następnie Doktorantka zaprezentowała wprowadzenie (28 stron), w którym scharakteryzowała krótko składniki wchodzące w skład układów badawczych oraz biomateriały w kontekście biokompatybilności i aktywności przeciwbakteryjną, po czym omówiła metody zastosowane w badaniach stanowiących podstawę dysertacji. Informacje, te zostały dobrane prawidłowo pod kątem tematyki badań eksperymentalnych, omówionych w dalszej części pracy w oparciu o aktualną literaturę. Kolejny rozdział 6, to syntetyczny opis eksperymentalnych wyników załączonych 10 publikacji oraz dwóch artykułów przeglądowych (36 stron). W tym rozdziale wyniki przedstawiono na 16 rysunkach i w 6 tabelach. Pracę kończy podsumowanie i siedemnaście istotnych wniosków z punkt widzenia potencjalnych zastosowań otrzymanego biomateriału, a także literatura (202 pozycje), streszczenie w języku polskim, podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki, oświadczenia wszystkich współautorów oraz kopie dwunastu artykułów naukowych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Łącznie praca liczy zatem 310 stron. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że pracę czytałoby się lepiej, gdy zawierała wykaz symboli i skrótów stosowanych w tak obszernym opracowaniu.



W publikacjach **D1 – D3** przedstawiono wyniki badań eksperymentalnych dotyczące charakterystyki fizykochemicznej dyspersji wodnej chitozan – tlenek tytanu (IV) o różnych stosunkach molowych składników i w szerokim zakresie pH. Przeprowadzone badania wykazały adsorpcje makrocząsteczek chitozanu na cząstkach TiO_2 a następnie ich pokrycie filmem chitozanowym, co zapobiega agregacji cząstek TiO_2 oraz zwiększa wyraźnie stabilność badanych układów, a także wzmacnia właściwości fotokatalityczne TiO_2 w układzie kompozytowym. Analiza różnych składów, w szerokim zakresie pH (3-9) pozwoliła wybrać najstabilniejszy układ Ch/ TiO_2 do dalszych badań pod kątem oceny biokompatybilności i aktywności przeciwbakteryjnej.

Praca **D4** stanowi przegląd doniesień literaturowych z lat 1993 - 2019 związanych z inżynierią tkanek miękkich w kontekście kompozytów sztucznej skóry. Doktorantka zadeklarowała w niej 100% udział, zatem może stanowić ona odpowiednik części literaturowej klasycznych prac doktorskich. Artykuł przedstawia badania dotyczące wykorzystania w układach złożonych chitozanu, kwasu hialuronowego i tlenku tytanu (IV), a dokładniej układy dwuskładnikowe chitozan/kwas hialuronowy oraz tlenek tytanu/biopolimer. Autorka omawia także wymagania dotyczące materiałów stanowiących substytut skóry.

Publikacja **D9**, jest drugim artykułem przeglądowym, w którym Autorzy przedstawili wpływ czynników fizykochemicznych i biologicznych na biokompatybilność biomateriałów. Opisano, też najważniejsze metody modyfikacji powierzchni w celu nadania dodatkowych cech kluczowych z punktu widzenia zastosowania tych materiałów w organizmie człowieka. Ponadto, przedstawiono stan badań nad wykorzystaniem polisacharydów, w tym chitozanu jako biomateriału, głównie w zastosowaniach w obszarze inżynierii tkankowej w kombinacji z innymi polimerami naturalnymi i/lub związkami małocząsteczkowymi.

W pracach **D5-D8** oraz **D10-D12** oceniono wpływ dodatku kwasu hialuronowego na stabilność i właściwości dyspersji chitozan/tlenek tytanu (IV) oraz filmu utworzonego na podłożu stałym tj. mika lub płytki szklane, oceniono także biokompatybilność badanych układów oraz aktywność przeciwbakteryjną. Przeprowadzone badania wykazały, iż dodatek HA poprawia stabilności zarówno układów jedno- jak i dwuskładnikowych. Parametry



topograficzne filmów AA/Ch/TiO₂ i AA/Ch/HA/TiO₂ nie zależą od zastosowanego podłoża. W przeprowadzonych badaniach Autorzy stwierdzili, iż układ trójskładnikowy Ch/HA/TiO₂ nie zaburza struktury błon biologicznych wytworzonych z wybranych fosfolipidów, co potwierdza biokompatybilność badanego układu. Ponadto, układ ten posiada dużą aktywność przeciwbakteryjną. W publikacji D11 opisano po raz pierwszy wykorzystanie błon biomimetycznych otrzymanych w formie lipidów wyizolowanych z dwóch szczepów bakterii do oceny aktywności przeciwbakteryjnej badanych dyspersji.

Do roli recenzenta obok ogólnej oceny rozprawy, należy przedstawienie uwag polemicznych i wskazanie pewnych nieścisłości. W związku powyższym chciałabym poniżej zebrać kilka uwag i wątpliwości dotyczących pracy.

- ⊙ Czy w przeprowadzonych badaniach dokonała Pani charakterystyki stosowanych polimerów tj. wyznaczyła Pani średni ciężar cząsteczkowy, stopień polidispersji dla polimerów, a w przypadku Ch stopień deacetylacji?
- ⊙ na str. 44, w rozdz. 6 *Syntetyczny opis uzyskanych wyników*, Doktorantka podkreśliła, „...iż wszystkie materiały wchodzące w skład układu badawczego pochodziły ze źródeł naturalnych lub zostały pozyskane metodami biotechnologicznymi.”, zatem, które z zastosowanych składników były pochodzenia naturalnego, a które otrzymano metodami biotechnologicznymi? Czy zna Pani dokładne źródło pochodzenia poszczególnych polisacharydów z których je otrzymano/wyizolowano, zastosowaną metodę, ich czystość?
- ⊙ Czy we wszystkich pracach wykorzystano te samą próbkę/partię Ch i HA? Czy próbowała Pani stosować chitozan czy HA o innej charakterystyce?
- ⊙ Czy we wszystkich pracach stosowano taką samą procedurę/protokół przygotowania roztworów polimerowych, a następnie dyspersji? Czasami w publikacjach podany jest bardziej dokładny opis, niż w innych przypadkach np. w pracy D11 roztwór chitozanu przygotowano z użyciem homogenizatora i wymieniono konkretny model urządzenia, w pracach D5 i D10 dyspersje podano sonifikacji etc. W jaki sposób mieszano roztwór HA z kwasem octowym?



- ⊙ str 48, rys. 16. - podpis do rysunku sugeruje, iż w pracy D2 są przedstawione widma układu Ch/HA/TiO₂, natomiast praca D2 dotyczy tylko układu Ch/TiO₂, w której przedstawiono jedynie trzy widma pokazane w panelu po lewej stronie rys. 16.
- ⊙ W publikacji, ani w opracowaniu, nie podano liczby skanów, ani rozdzielczości zastosowanej w badaniach spektroskopii w podczerwieni.
- ⊙ Czy w badaniach stosowała Pani kwas hialuronowy w formie soli sodowej? Otrzymane widmo IR świadczy, że kwas hialuronowy występuje właśnie w takiej formie, zatem w roztworze wodnym występują aniony karboksylanowe. Czy widma rejestrowano dla roztworów, dyspersji czy filmów polimerowych? Jakiego było pH układów, dla których zarejestrowano widma? Jak aniony karboksylanowe wpływają na stabilność badanych układów oraz oddziaływania między składnikami dyspersji w kontekście do dyskusji przedstawionej na str. 49?
- ⊙ str 49, rys. 17. - podpis do rysunku jest błędny, przedstawione wyniki odnoszą się do układu dwuskładnikowego Ch/TiO₂.

Wszystkie powyższe uwagi oraz pytanie mają jedynie charakter polemiczny lub wskazują na drobne błędy, które są nieuniknione podczas pisanie tak obszernej pracy i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej rozprawy.

Wnioski końcowe

Reasumując, badania eksperymentalne przeprowadzone przez Panią mgr Agatę Ładniak stanowią istotny wkład w opracowanie i kompleksową charakterystykę nowych biomateriałów trójskładnikowych na bazie chitozanu, kwasu hialuronowego i tlenku tytanu (IV) w formie dyspersji oraz na podłożu stałym. Badany układ trójskładnikowy wykazuje wysoką skuteczność bakteriobójczą wobec bakterii Gram-ujemnych pałeczek okrężnicy (*Escherichia coli*) i Gram-dodatnich bakterii gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i może być wykorzystany do produkcji filmów biokompatybilnych wykazujących aktywność przeciwbakteryjną.

Stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji dysertacja Pani mgr Agaty Ładniak stanowiąca cykl monotematycznych dwunastu artykułów spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w art. 13 Ustawy o stopniach naukowym i tytule naukowych oraz o



stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.).
W związku z tym wnoszę do Rady Instytutu Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Pani mgr Agaty Ładniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie jako recenzent składam formalny wniosek do Rady Instytutu Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o wyróżnienie dysertacji Pani mgr Agaty Ładniak stosowną nagrodą. Mój wniosek jest zasadny – przemawiają za tym publikacje w renomowanych czasopismach, duży potencjał aplikacyjny opracowanych układów oraz dorobek naukowy mgr Agaty Ładniak. Znaczenie otrzymanych wyników eksperymentalnych jest istotne z praktycznego i poznawczego punktu widzenia.

dr hab. Katarzyna Lewandowska, prof. UMK