



POLITECHNIKA WARSZAWSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Prof. dr hab. inż. Kamil Wojciechowski

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel/fax.: 22-234-5106, E-mail: kamil.wojciechowski@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2022-11-21

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Agaty Ładniak

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska *"Charakterystyka oddziaływań TiO_2 /biopolimer w układzie dyspersyjnym i na podłożu stałym w aspekcie biokompatybilności"* autorstwa mgr Agaty Ładniak zrealizowana została pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Wiącek, prof. uczelni (promotor) oraz dr hab. Małgorzaty Jurak, prof. uczelni (promotor pomocniczy) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Tematyka badań wpisuje się w aktualne nurty badawcze związane z wykorzystaniem surowców naturalnych, czerpiąc jednocześnie inspiracje z bogatych tradycji badań fizykochemii granic międzyfazowych zespołu prof. A. Wiącek i Katedry Zjawisk Międzyfazowych Wydziału Chemii UMCS.

Rozprawa stanowi cykl 12 publikacji, opublikowanych w latach 2017-2022, opatrzonych tzw. przewodnikiem. Należy tu zauważyć, że w dorobku Kandydatki znajduje się łącznie aż 16 artykułów recenzowanych oraz 6 rozdziałów w monografiach w języku polskim i 2 w języku angielskim, a także wiele wystąpień konferencyjnych - wyniki prowadzonych przez nią badań zaprezentowano jako 37 wystąpień ustnych i 28 posterowych. Część badań w ramach doktoratu finansowana była z kierowanego przez Kandydatkę projektu „Grant dla młodych naukowców”, a od roku 2022 jest Ona kierownikiem projektu NCN Preludium. Wszystkie publikacje stanowiące recenzowane dzieło dotyczą tematyki oddziaływań między dwoma biopolimerami (chitozan i kwas hialuronowy) a nanocząstkami TiO_2 w różnych układach modelowych: dyspersjach wodnych, warstwach na podłożu stałym, monowarstwach Langmuira oraz w hodowlach komórkowych. Prace zostały uszeregowane i omówione w przewodniku do rozprawy w sposób dobrze przemyślany i usystematyzowany, prowadząc czytelnika przez kolejne przybliżenia docelowego układu stanowiącego materiał kompozytowy o właściwościach przeciwbakteryjnych. Należy tu podkreślić wysoki stopień skomplikowania badanego układu trójskładnikowego, szczególnie jeśli wziąć pod uwagę zarówno

oddziaływania między składnikami docelowego materiału kompozytowego (chitozan, kwas hialuronowy i TiO_2), jak i oddziaływania poszczególnych składników i ich adduktów z powierzchniami, z którymi będą one docelowo w kontakcie. Przewodnik stanowi dojrzałe opracowanie całościowe poszczególnych etapów cząstkowych rozprawy, jakimi było 12 publikacji o charakterze oryginalnym (D1-D3, D5-D8, D10-D12) i przeglądowym (D4, D9) wchodzących w jej skład.

Od strony edycyjnej praca przygotowana jest starannie, liczne schematy ilustrujące opisy w tekście ułatwiają lekturę dzieła. Przewodnik rozpoczyna się od przedstawienia uzasadnienia wyboru tematu, gdzie przedyskutowano problem biogodności, który jest motywem przewodnim rozprawy. W kolejnej części przedstawiono główne cele, jakie postawiła przed sobą mgr Agata Ładniak, oraz szczegółowe hipotezy badawcze, których weryfikację znaleźć można w dalszych rozdziałach przewodnika i – bardziej szczegółowo – w cyklu 12 publikacji. Jako cel główny Kandydatka wskazała stworzenie innowacyjnych biomateriałów wykorzystując synergię właściwości chemicznych i biologicznych 3 składników pochodzenia naturalnego, z których każdy wykazuje samodzielnie korzystne dla organizmu człowieka działanie biologiczne. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na często zmieniającą się legislację UE, zgodnie z którą stosowanie w żywności TiO_2 zostało ostatnio zakazane ze względu na możliwe działanie genotoksyczne (Rozporządzenie Komisji (UE) 2022/63 z dnia 14 stycznia 2022 r.). W dalszych etapach rozważa się jego zakazanie również w produktach leczniczych, a w formie nanometrycznej TiO_2 nie może być również stosowany w kosmetykach, z których mógłby on wnikać do organizmu drogą wziewną. Należy jednak podkreślić, że w momencie wyboru układu do badań w ramach recenzowanej rozprawy, nano- TiO_2 cieszył się jeszcze dobrą opinią wśród legislatorów UE.

Kolejne części przewodnika dostarczają wyczerpujące informacje pomocne w analizie cyklu publikacji: „Wprowadzenie” zawierające niezbędne definicje oraz przybliżające stosowane w pracy modele układów biologicznych, „Główne metody badawcze” i – najważniejsze z punktu widzenia pracy - „Syntetyczny opis uzyskanych wyników” oraz „Podsumowanie i wnioski”. W tych ostatnich częściach w sposób wyczerpujący omówiono najważniejsze wyniki i wnioski z cyklu publikacji. Układ przewodnika został dobrze przemyślany i wskazuje na głębokie zrozumienie tematyki pracy przez Kandydatkę. Jest to tym bardziej godne pochwały, że wachlarz stosowanych przez Nią technik badawczych jest dość szeroki, co wymagało nie tylko umiejętności analizy wyników z poszczególnych etapów badań, ale także - spojrzenia na nie całościowo. O ile sam cykl 12 publikacji stanowi imponujące dzieło, to trudno byłoby tylko na podstawie analizy samych publikacji określić dojrzałość naukową Kandydatki, będącej jednym z współautorów. Jednak lektura przewodnika, a w szczególności ostatnich rozdziałów, nie pozostawia wątpliwości co do dojrzałości naukowej mgr Agaty Ładniak.

Do pracy dołączono również oświadczenia współautorów wszystkich 12 prac, które także potwierdzają znaczny wkład Jej pracy, zarówno eksperymentalnej, jak i koncepcyjnej (dyskusja wyników, przygotowanie publikacji, łącznie z redagowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów). Znaczna część prac została opublikowana w cenionych czasopismach o wysokich (>3.4) i bardzo wysokich (15.2) wartościach współczynnika oddziaływania (*impact factor*, IF). Można się spodziewać, że przynajmniej dla części czasopism (np. *Colloids and Interfaces*) wkrótce zostaną określone wartości IF, co powiększy również łączny IF Autorki. Wśród prac znajdują się pozycje o wysokiej punktacji na tzw. liście ministerialnej (140-200 pkt MEiN). Należy tu podkreślić 2 istotne fakty dotyczące przedstawionych jako dzieło publikacji, dobitnie świadczące o istotnej roli Kandydatki w ich powstawaniu:

- 1) w większości prac jedynymi współautorkami są Panie promotor
- 2) w większości prac (szczególnie po zmianie nazwiska, po roku 2018) Kandydatka jest autorem korespondencyjnym.

W ramach rozprawy Kandydatka zaproponowała użycie układów modelowych (np. jednoskładnikowe monowarstwy lipidowe), co stanowi jednocześnie o mocnych i słabszych stronach pracy. Do tych pierwszych należy niewątpliwie względna prostota układu i możliwość bardziej dogłębnej interpretacji wyników. Jednocześnie jednak uogólnianie wniosków uzyskanych dla uproszczonych modeli na znacznie bardziej złożone układy rzeczywiste wymaga dużej dozy wstrzeźliwości. Należy podkreślić, że w większości prac i w przewodniku Autorka rzeczywiście zachowuje taką wstrzeźliwość. Jedynie sporadycznie spotkać można takie stwierdzenia, jak „Wymienione fosfolipidy DPPC oraz DOPC zostały wybrane do badań, gdyż stanowią one główne składniki błon komórkowych w komórkach człowieka [104, 105, 108]” (str. 40). Niewątpliwą zaletą wybranych fosfolipidów jest bogata wiedza o ich zachowaniu fazowym oraz dostępność, ale trudno zgodzić się ze stwierdzeniem, że stanowią one główne składniki błon komórkowych człowieka (np. DPPC występuje w znaczących ilościach jedynie w pęcherzykach płucnych). Niestety wielu autorów stosuje takie uproszczenia, mimo że obecne analizy lipidomiczne pozwalają najczęściej jedynie na określenie oddzielnie rodzaju łańcuchów i głów lipidów, ale nie na określenie struktury konkretnych fosfolipidów.

W swoich badaniach Autorka poszła jednak znacznie dalej, nie poprzestając na układach jednoskładnikowych, i w części badań zastosowała również znacznie bliższe rzeczywistym układom ekstrakty lipidowe bakterii, a nawet same bakterie. Do pozostałych najważniejszych osiągnięć przedstawionej do recenzji rozprawy zaliczam:

- 1) Systematyczne podejście do opisu złożonego układu wieloskładnikowego i wielofazowego. Aby sprostać bardzo ambitnemu celowi, Autorka konsekwentnie zwiększała stopień

skomplikowania układów modelowych, z każdym krokiem (publikacją) zbliżając się coraz bardziej do układów rzeczywistych.

- 2) Wykonanie szczegółowych analiz składowych energii powierzchniowej i wpływu składu kompozytów na te składowe.
- 3) Wykazanie wyraźnego wpływu chitozanu na występowanie przejść fazowych w monowarstwach DPPG.
- 4) Zastosowanie ekstraktów lipidowych bakterii *E. coli* i *S. aureus* jako układów biomimetycznych do testowania możliwego działania przeciwbakteryjnego.
- 5) Wykazanie istnienia korelacji między wpływem badanych dyspersji na modelowe monowarstwy biomimetyczne a działaniem biologicznym (przeciwbakteryjnym) w układach rzeczywistych.

Mimo ogólnej bardzo wysokiej oceny rozprawy chciałbym również zwrócić uwagę na kilka drobnych niedociągnięć merytorycznych i edycyjnych. Oczekuję, że Autorka podczas obrony podejmie dyskusję na temat punktów 1-3 (pozostałe mają charakter uwag technicznych i nie wymagają dyskusji, chyba że Autorka się z nimi nie zgadza).

- 1) W pracy D3 stwierdzono całkowity zanik sygnałów charakterystycznych dla grup amidowych w widmach XPS po dodaniu TiO_2 do chitozanu. Zaobserwowano również inne zmiany, część z nich nawet opisano ilościowo („zmniejszenie ilości grup C-OH i/lub C-O-C (...) do 17,4%”), jednak ani w pracy D3, ani w przewodniku nie udało mi się znaleźć dyskusji tych wyników z punktu widzenia możliwych reakcji chemicznych. Jaka reakcja chemiczna między grupami amidowymi a TiO_2 mogłaby zachodzić w trakcie tworzenia kompozytu ?
- 2) W kontekście powyższych wniosków z badań XPS jak należy rozumieć schemat z rys. 25, gdzie zamiast obojętnych cząstek TiO_2 pokazano oddziaływania jonowe i koordynacyjne z kationem Ti^{4+} (str. 66) ? Czy w tworzeniu kompozytu biorą udział tylko jony Ti^{4+} , czy również cząstki TiO_2 ?
- 3) Sposób prezentacji przesunięcia izoterm kompresji zastosowany w pracy D10 i powielony w przewodniku na rys. 21, a także towarzysząca mu dyskusja są dla mnie niezrozumiałe. Po pierwsze – o ile dobrze zrozumiałem ten sposób prezentacji – na osi x podano symbolicznie składy subfazy, które nie zmieniają się przecież w sposób ciągły, ani nie są ze sobą powiązane. W tej sytuacji stosowanie linii zamiast dyskretnych punktów nie jest niczym uzasadnione. Jest to tym bardziej mylące, że tak zaprezentowane wyniki przypominają wyglądem odwrócone izotermy kompresji. Po drugie, w dyskusji Autorka skupiła się tylko na (stosunkowo) niskich wartościach ΔA (oś y) dla $\Pi=35$ mN/m, pomijając bardzo istotne różnice (dochodzące do 25-30 mN/m) dla $\Pi=0,5$ mN/m w przypadku Sposobu 2. i 3. W tej samej dyskusji znalazło się też niefortunne sformułowanie: „(...) przy wysokim skompresowaniu (Rys. 21), tj. przy wartościach ciśnień powierzchniowych

charakterystycznych dla błon organizmów żywych (30 – 35mN/m).” (str. 55). W przypadku błon organizmów żywych, które są dwuwarstwami, nie można mówić o ciśnieniu powierzchniowym, a jedynie o upakowaniu cząsteczek lipidów w monowarstwie sprężonej do wartości Π w zakresie 30-35 mN/m wykazującym podobieństwo do tego, jakie występuje w błonach komórkowych. Podobny skrót myślowy znaleźć można na str. 61-62, 64 oraz w oryginalnych pracach (D10, D12).

- 4) Czy poprawne jest określenie „oddziaływania elektrono-akceptorowe γ_s^{+} ” (np. str. 54) ? Czy raczej powinno się mówić o oddziaływaniach kwasowo-zasadowych i o ugrupowaniach elektrono-akceptorowych lub elektrono-donorowych obecnych na powierzchni ?
- 5) Zarówno w oryginalnych pracach, jak w i w przewodniku pojęcie punktu ładunku zerowego (PZC, *point of zero charge*) jest stosowane wymiennie z punktem izoelektrycznym (IEP, *isoelectric point*). Mimo że ich wartość numeryczna jest często taka sama (choć nie zawsze), odnoszą się one jednak do innych zjawisk, a do ich wyznaczania stosuje się odmienne metody badawcze.
- 6) Czy we fragmencie: „(...) odnotowano przesunięcie izotermy w kierunku mniejszych powierzchni, co oznacza wzmocnienie oddziaływań przyciągających, w przypadku AA/HA prawdopodobnie w wyniku dużych zmian lepkości.” (str. 56) nie pomyślono przyczyny ze skutkiem ? Spodziewałbym się, że to mikroskopowe zmiany oddziaływań mogą wpływać na zjawiska makroskopowe, takie jak lepkość, a nie odwrotnie.
- 7) O ile niskie wartości modułu ściśliwości C_s^{-1} można rzeczywiście interpretować jako oznakę zwiększonej płynności monowarstw, to stosowanie zamiennie terminów „elastyczność” i „płynność” nie jest poprawne (np. str. 70).
- 8) Na str. 23 Autorka używa spolszczonej nazwy „raftów” (od ang. *raft*). Moim zdaniem polskie tłumaczenie słowa „*raft*” jako „tratwa” dostatecznie dobrze oddaje charakter tych obszarów błony biologicznej. W tym samym zdaniu wkrały się jeszcze dwa drobne błędy: 1) tratwy („*rafty*”) nie powstają w monowarstwach, ale w dwuwarstwach lipidowych; 2) termin „dynamika molekularna” odnosi się do zwyczajowo do metod symulacji komputerowych układu cząsteczek.
- 9) Sformułowanie „adsorpcja cząsteczek wody i jej roztworów” (str. 24) jest skrótem myślowym – o ile rzeczywiście można mówić o adsorpcji cząsteczek wody, o tyle o „adsorpcji roztworów” – już nie.
- 10) Zdanie ze str. 26 „Najistotniejsza jest reakcja woda – kwas Lewisa, czyli reakcja z grupą funkcyjną będącą donorem elektronów -NH₂, -COOH, -COC-, -OH lub cząsteczką z luką elektronową” ma niezbyt jasną konstrukcję. Można by z niego wnioskować, że kwasem Lewisa jest donor elektronów – czy taka była intencja Autorki ?

- 11) Na str. 28 podano nieprawidłową definicję środków przeciwbakteryjnych: jako „przeznaczone do kontaktu z zewnętrznymi częściami ciała ludzkiego lub z zębami oraz błonami śluzowymi jamy ustnej, których celem jest wyłącznie lub głównie ich czyszczenie, perfumowanie, zmiana wyglądu, korygowanie zapachów ciała i/lub ich ochrona/utrzymywanie w dobrym stanie”. Podana definicja dotyczy w istocie kosmetyków, a nie środków przeciwbakteryjnych i pochodzi z tzw. Rozporządzenia Kosmetycznego 1223/2009.
- 12) Na rys. 9 (str. 29) pokazano zdjęcia mikroskopowe bakterii, a nie „Struktury bakterii”, jak sugeruje podpis pod rysunkiem.
- 13) Na str. 41 napisano: „Według danych literaturowych [131, 143] szczepy *E. coli* składają się z 5% kardiolipiny, 15% fosfatydyloglicerolu i 80% fosfoatydyloetanolaminy, natomiast *S. aureus* z 42% kardiolipiny i 58% fosfatydyloglicerolu.”. Prawdopodobnie chodzi o błony komórkowe szczepów *E. coli*, nie o same szczepy ?
- 14) Do drobnych błędów językowych zaliczyć można również stwierdzenia typu „Omówiono układy o pH nie tylko kwaśnym (...)” (str. 45), czy „wzrost intensywności piku przypisywanego wiązaniom rozciągającym N-H (...)” (str. 47), chociaż zdarzają się one sporadycznie.
- 15) Na str. 48 podano prawdopodobnie omyłkowo odnośnik do rys. 16 zamiast 17.
- 16) Ze względu na poszerzenia widm IR, zwykle nie stosuje się określenia „piki absorpcyjne”, a raczej „pasma absorpcyjne” (np. str. 47, 48). Zaskakujące jest też stwierdzenie: „Dodatkowe pojawienie się pasma absorpcyjnego w zakresie $677 - 695\text{cm}^{-1}$ charakterystycznego dla związków nieorganicznych (tj. poniżej 1000cm^{-1})”, sugerujące że obszar daktyloskopowy poniżej 1000cm^{-1} zawiera tylko pasma charakterystyczne dla związków nieorganicznych.
- 17) Na str. 63 występuje rozbieżność między nazwą polską „transport wewnątrzkomórkowy” a podaną w nawiasie angielską: „*transdermal drug delivery*” – ta ostatnia oznacza transport przezskórny, a nie wewnątrzkomórkowy.
- 18) Podobna wątpliwość dotyczy poprawności podanej na str. 64 nazwy fazy żelowej DPPC w warstwach LB. Faza żelowa („uporządkowana faza stała (*ang. solid-ordered phase*)”) może występować w dwuwarstwach lipidowych, ale (według mojej wiedzy) nie w monowarstwach.

Waga wyżej opisanych drobnych niedociągnięć nie umniejsza jednak mojej ogólnej bardzo wysokiej oceny przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Otrzymane wyniki badań potwierdziły istnienie oddziaływań w układzie TiO_2 -kwas hialuronowy-chitozan, umożliwiającym kontrolowanie właściwości fizykochemicznych i biologicznych mieszanin. Przedstawiony spójny cykl 12 publikacji stanowi istotny wkład w dziedzinę fizykochemii powierzchni i tworzenia materiałów o właściwościach biobójczych. Rozprawa przedstawia dużą wartość pod względem poznawczym i wnosi elementy nowości w dziedzinie badań nad oddziaływaniami polielektrolity - nanocząstki

nieorganiczne. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agaty Ładniak zatytułowana "*Charakterystyka oddziaływań TiO₂/biopolimer w układzie dyspersyjnym i na podłożu stałym w aspekcie biokompatybilności*" spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom rozprawy, znaczący udział Kandydatki w powstaniu cyklu 12 publikacji, wśród których znajdują się prace opublikowane w bardzo cenionych czasopismach (np. *Advances in Colloid and Interface Science*, *Colloids and Interfaces A*, czy *Biomaterials Advances*) oraz wysoką liczbę cytowań (144 bez autocytowań, wg bazy Scopus z dn. 17.11.2022) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.



