



3 grudnia 2024

RECENZJA**Rozprawy doktorskiej mgr Natalii Przybylskiej
pt. „Własności antybiotyku (ciprofloksacyny) uwięzionego w
nanotubach węglowych. Właściwości antybakteryjne układu.”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana na Wydziale Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką promotora prof. dr hab. Małgorzaty Śliwińskiej-Bartkowiak, specjalizującej się od lat w badaniach nad przemianami zachodzącymi w ograniczonych przestrzeniach porów, oraz promotora pomocniczego dr Mikołaja Kościńskiego.

Badania mechanizmów procesów zachodzących na różnego typu granicach fazowych mają olbrzymie znaczenie zarówno teoretyczne jak i praktyczne. W ostatnich latach zainteresowanie tą tematyką wzrosło ze względu na otrzymanie różnego typu nanomateriałów oraz ich szerokie wykorzystanie w wielu technologiach oraz medycynie. Zwiększenie udziału powierzchni oraz roli sił powierzchniowych w porównaniu z fazą objętościową determinuje zmianę właściwości nanomateriałów i nanocząstek oraz zwiększoną reaktywność w porównaniu do materiałów masowych. Ze względu na swoje właściwości nanomateriały są coraz szerzej stosowane w wielu produktach codziennego użytku, remediacji środowiska a także w medycynie i farmacji. Technologie otrzymywania nowych typów materiałów o rozmiarach nano oraz metody ich funkcjonalizacji pozwalają na ich dostosowanie do konkretnych potrzeb. Szczególną rolę zaczynają odgrywać w medycynie, w tym m.in. w opracowaniu ukierunkowanych układów dostarczania leków, diagnostyce, obrazowaniu i terapiach celowanych. Dynamiczny rozwój nanotechnologii rozszerzy te zastosowania także na inne obszary. Zważywszy na aktualność badań związanych z szeroko pojętą nanotechnologią wybór tematyki recenzowanej rozprawy doktorskiej – badania własności antybiotyku (ciprofloksacyny) uwięzionego w nanorurkach węglowych, jest więc bardzo trafny.

Recenzowana praca doktorska składa się z części literaturowej poświęconej charakterystyce właściwości nanomateriałów, nanocząstek, mezoporowatych materiałów krzemionkowych, oraz stosowanych w badaniach materiałów – ciprofloksacyny i nanorurek węglowych, część ta stanowi około 25% rozpraw. Przedstawione zagadnienia są ściśle związane z tematyką realizowanej pracy doktorskiej. Kolejny rozdział poświęcony został szczegółowemu opisowi technik badawczych zastosowanych do analizy oddziaływań adsorbent – adsorbat i charakterystyk badanych układów, oraz metod pomocniczych. Użyte w badaniach metody obejmują typowe techniki fizykochemiczne, ale Doktorantka wykonała też samodzielnie testy mikrobiologiczne, niezbędne do kompleksowej analizy badanych układów. Przedstawione w części literaturowej zagadnienia odnoszą się ściśle do tematyki rozprawy i stanowią dobry wstęp do lektury części doświadczalnej. Jako pewien niewielki mankament tej części rozprawy muszą jednak wskazać powtórzenia niektórych omówionych już zagadnień, przykładowo klasyfikacja porów według IUPAC jest podana na str. 14 i powtórzona na 40. Ponadto uważam, że Autorka powinna mocniej podkreślić istotny walor nowości naukowej swoich badań odnosząc się do danych literaturowych dotyczących analizy oddziaływań w układzie antybiotyk – nanomateriał, czy szerzej substancja aktywna – nanomateriał.

Część doświadczalna obejmuje przedstawienie i analizę wyników badań. W badaniach wykorzystano jednościenne nanorurki węglowe o średnicy 1,7 nm i 30 nm. Należy podkreślić trafny dobór technik zastosowanych do analizy oddziaływań pomiędzy ciprofloksacyną, a powierzchnią nanorurek węglowych oraz pogłębionej charakterystyki tego układu: pomiary kąta zwilżania (pomocnicze pomiary gęstości i lepkości roztworów antybiotyku), mikroskopia sił atomowych AFM, skaningowa kalorymetria różnicowa DSC, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera FTIR, spektroskopia Ramana. Autorka wykonała również testy mikrobiologiczne (ilość zaadsorbowanego leku wyznaczona na podstawie rozmiarów i objętości porów określonych z izotermy adsorpcji azotu), które pozwoliły na zbadanie efektywności antybakteryjnej układu antybiotyk – nanorurki. Należy podkreślić, że tematyka podjęta w opiniowanej pracy jest bardzo istotna przy wykorzystaniu nanomateriałów do zastosowań medycznych. Analiza oddziaływań w układach roztwór leku – powierzchnia nośnika oraz zmian efektywności leczniczej związanych z umieszczeniem leku w ograniczonej przestrzeni porów może wskazać na kierunki wykorzystania oraz metody modyfikacji materiałów pod kątem zwiększenia efektu terapeutycznego.

Główna część badań doświadczalnych koncentrowała się na analizie różnych aspektów charakterystyk układów antybiotyk – nanorurki węglowe przy wykorzystaniu wybranych technik. Pomiary kątów zwilżania w różnych układach pozwoliły na pokazanie

ogólnego wpływu charakteru powierzchni materiału na oddziaływania typu ciecz – ciało stałe. Wstępne badania porównawcze wykazały zwiększenie kąta zwilżania, a więc wzrost hydrofobowości powierzchni materiałów porowatych w porównaniu z powierzchniami gładkimi, dodatkowo wraz ze zmniejszeniem rozmiarów porów efekt ten wzrastał. Dla wody na różnego typu powierzchniach zaobserwowano silną korelację pomiędzy wartościami zmierzonych kątów zwilżania a mikroskopowym parametrem zwilżania. Wprowadzenie ciprofloksacyny do rozpuszczalnika, nawet w niewielkich stężeniach, powodowało zmniejszenie kąta zwilżania na powierzchniach gładkich, co wskazuje na silniejsze oddziaływania roztwór – powierzchnia. Natomiast w przypadku nanorurek węglowych zaobserwowano wyższe kąty zwilżania, a więc słabsze oddziaływania. Wzrost stężenia antybiotyku zwiększał oddziaływania w badanych układach. Należy jeszcze podkreślić, że w badaniach stosowano stężenia roztworów ciprofloksacyny typowe dla zastosowań medycznych: 1 i 2 mg/ml.

Spektroskopia Ramana pozwoliła na zbadanie mikrostruktury nanorurek węglowych, struktury elektronowej i określenie wpływu wprowadzenia ciprofloksacyny w pory na zmiany strukturalne. W przypadku nanorurek o średnicy 1,7 nm określono średnicę nanorurek i potwierdzono jednorodność ich struktury oraz wykazano ich metaliczną strukturę elektronową. Nanorurki o średnicy 30 nm mają strukturę bardziej amorficzną, wysoce zdefektowaną, charakteryzującą się półprzewodzącymi właściwościami elektrycznymi. Pomiary przeprowadzone techniką Ramana dla nanorurek wypełnionych roztworem ciprofloksacyny pokazały zwiększenie uporządkowania, zmniejszenie amorficzności w porównaniu z czystymi materiałami. Wykazano również wpływ temperatury na zmiany struktury badanych układów – największe uporządkowanie, stabilność zaobserwowano w przedziale 20 – 30 °C. Powyżej 30 °C zaobserwowano wzrost ich amorficzności, a tym samym biokompatybilności.

Bardzo ciekawe wyniki otrzymano metodą spektroskopii w podczerwieni, które w połączeniu z analizą widm Ramana pozwoliły na określenie najbardziej prawdopodobnego ułożenia cząsteczki ciprofloksacyny w ograniczonej przestrzeni nanorurek węglowych o średnicy 1,7 nm. W podczerwieni zaobserwowano wygaszenie niektórych wiązań (wiązania C-C w pierścieniu aromatycznym) oraz zachowanie aktywności wiązań najważniejszych z punktu widzenia właściwości bakteriobójczych antybiotyku (wiązania azotowe, grupa akylowa). Generalnie badania porównawcze wykonane techniką FTIR dla objętościowych roztworów ciprofloksacyny i zamkniętych w nanorurkach wykazały duży wpływ sił powierzchniowych na właściwości i ułożenie cząsteczki leku w ograniczonej przestrzeni porowatej.

Pomiary techniką skaningowej kalorymetrii różnicowej wykazały zmiany temperatury topnienia ciprofloksacyny uwięzionej w porach w porównaniu do formy swobodnej antybiotyku. W połączeniu z analizą kątów zwilżania w badanych układach wykazano wpływ mikroskopowego parametru zwilżania związanego z oddziaływaniami powierzchnia – ciecz na przejścia fazowe w porach.

Ostatnim etapem badań było wykonanie testów na bakteriach E. Coli oraz zobrazowanie techniką AFM uszkodzeń morfologiczne mikrobów potraktowanych antybiotykiem naniesionym na nośnik. Wykazały one, że zastosowanie nanorurek węglowych z ciprofloksacyną wydłuża czas destrukcji ścian komórkowych bakterii, ponadto zauważono, że nanorurki aglomerują wokół mikrobów. Porównując terapeutyczne działanie samej ciprofloksacyny i antybiotyku zaadsorbowanego w nanorurkach stwierdzono znaczący spadek adhezji bakterii po potraktowaniu ich nanorurkami wypełnionymi antybiotykiem, co świadczy o zwiększeniu efektu leczniczego leku – wolniejsze uwalnianie z nośnika i wydłużone działanie. Efekty te zaobserwowano w przypadku obu typów nanorurek o średnicy 1,7 i 30 nm. Bardzo ciekawe są wyniki analizy biofilmu bakteryjnego na podstawie zdjęć AFM. Wykazano inny mechanizm działania samej ciprofloksacyny oraz w formie zaadsorbowanej w nanorurkach. Antybiotyk niszczy komórki oderwane od biofilmu (zmniejszona adhezja), natomiast nanorurki zapobiegają tworzeniu biofilmu, co pozwala na zniszczenie większej liczby mikrobów.

Podsumowując mogę stwierdzić, że recenzowana praca doktorska reprezentuje bardzo wysoki poziom badań naukowych, spełniając z nadwyżką wymogi stawiane pracom doktorskim. Zrealizowane badania są bardzo aktualne, na szczególne podkreślenie zasługuje ich interdyscyplinarny charakter obejmujący fizykę, chemię i biologię. Oprócz badań metodami fizykochemicznymi Doktorantka wykonała również testy mikrobiologiczne, co znacząco poszerzyło Jej kompetencje naukowe jako fizyczki.

Praca jest napisana starannie, jednak z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na niektóre drobne uchybienia:

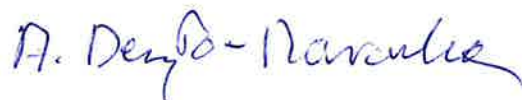
- Stosowanie nazwy pory krzemionkowe zamiast krzemionkowe materiały mezoporowate, jest to określenie żargonowe
- Rys. 3 – niedokończony podpis, brak zacytowanego źródła
- Słowo nanotuby jest kalką z języka angielskiego i lepiej jest stosować nazwę nanorurki
- Czcionki w opisach części rysunków są zbyt małe

- Nieprawidłowa numeracja Rys. 28 – powinno być 30, tak samo na str. 57, jest 29, powinno być 33 (odwołania do tego rysunek nie ma w tekście)
- Od str. 59 numeracja pod rysunkami zaczyna się znowu od pozycji 30 (w tekście od 34)
- Str. 93, podane w Tabeli 7 wartości powierzchni właściwej zawierają zbyt wiele cyfr znaczących, np. 145,9 m²/g. Błąd metody wyznaczania powierzchni właściwej z izoterm adsorpcji/desorpcji azotu wynosi kilka, nawet do kilkunastu %.

Stwierdzone drobne uchybienia w najmniejszym stopniu nie wpływają na bardzo wysoką oceną merytoryczną pracy doktorskiej mgr Natalii Przybylskiej. Badania doświadczalne Doktorantki, w których wykorzystywała nowoczesne fizykochemiczne techniki pomiarowe i testy mikrobiologiczne oraz dyskusja otrzymanych wyników reprezentują bardzo wysoki poziom. Techniki badawcze wybrane do analizy układów antybiotyków – matryca porowata wzajemnie się uzupełniają i potwierdzają uzyskane wyniki. Doktorantka wykazała, że potrafi zaplanować badania, przeprowadzić pomiary i zinterpretować otrzymane wyniki. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu do pracy naukowej. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Natalii Przybylskiej reprezentuje wysoki poziom naukowy i spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy wnoszą poważny wkład do rozwoju badań nad zmianami właściwości, struktury i oddziaływań adsorbat – adsorbent dla antybiotyku zamkniętego w ograniczonej przestrzeni porów. Dodam jeszcze, że mgr Natalia Przybylska jest współautorką 2 artykułów, które zostały opublikowane w czasopismach o wysokim IF (*Carbon* – 10,5, *Journal of Molecular Liquids* – 5,2) oraz kilku wystąpień na konferencjach międzynarodowych.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia całkowicie wszelkie ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Doktorantka jasno określiła cel pracy, zrealizowała zaplanowane badania, a otrzymane wyniki i ich interpretacja znacznie poszerzają stan wiedzy nad właściwościami układów substancja lecznicza – porowaty nośnik. W związku z tym **wnoszę do Rady Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Natalii Przybylskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Ponadto, biorąc pod uwagę

bardzo wysoki poziom badań oraz istotny element nowości w prezentowanych w doktoracie wynikach badań Autorki **wnoszę o nagrodzenie tej rozprawy ze względu na jej wartość naukową**. Jednocześnie chciałabym podkreślić, że kieruję się przy sformułowaniu tego wniosku głównie wysoką wartością naukową rozprawy doktorskiej. Podjęcie badań zawierających wyraźne elementy nowości naukowej, w tym szczególnie badań interdyscyplinarnych, może spowodować opóźnienie publikacji części wyników. Dotychczasowy dorobek publikacyjny mgr Natalii Przybylskiej obejmuje 2 artykuły (w tym 1 zawierający część wyników uzyskanych w trakcie badań przeprowadzonych w ramach doktoratu). Ponieważ Autorka opublikowała dotychczas tylko pewną część otrzymanych wyników sądzę, że Jej dorobek naukowy wkrótce się powiększy.



Prof. dr hab. Anna Deryło-Marczewska