

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Przybylskiej nt. „Własności antybiotyku (ciprofloksacyny) uwięzionego w nanotubach węglowych. Właściwości antybakteryjne układu.”

Prowadzone w kilku ostatnich dekadach badania zmierzające do opracowania nowych zaawansowanych układów dostarczania leków (*drug delivery system*) miały istotne znaczenie w terapii wielu chorób. Ich efektem było wykorzystanie do przenoszenia i dostarczania leków do określonego obszaru w organizmie nanocząstek różnego pochodzenia i o różnych rozmiarach. Zapewniają one uwalnianie substancji czynnych w sposób uzależniony od ich rozpuszczalności, przebiegu procesu dyfuzji i siły oddziaływania leku z nośnikiem. Uwalnianie leku z nośnika jest wynikiem jego desorpcji z powierzchni/porów adsorbentu. Odpowiednia struktura, morfologia, a także chemiczna budowa jego powierzchni zapewnia kontrolowane i często celowane (do miejsca przeznaczenia) dostarczenie substancji leczniczej, przy jednoczesnym minimalizowaniu działań niepożądanych dla organizmu.

Wśród zalet stosowania nanotechnologii w procesach dostarczania substancji terapeutycznych, należy wymienić zwiększoną siłę działania leku, precyzyjne jego ukierunkowanie na określone komórki oraz obniżoną toksyczność dla komórek, niezbędnych dla organizmu. W porównaniu z tradycyjnymi systemami dostarczania leków, ich działanie terapeutyczne można znacząco poprawić, łącząc je z nanocząstkami poprzez fizyczną enkapsulację, adsorpcję lub reakcję chemiczną. Wykorzystanie ich do dostarczania leków przynosi istotne korzyści, w tym wydłużony czas krążenia ogólnoustrojowego oraz trwałe i kontrolowane uwalnianie leków i celowane dostarczanie ich do tkanek. Badania nanotechnologiczne pozwalają na wykorzystanie znanych preparatów, ulepszenie ich skuteczności wraz z ograniczeniem działań niepożądanych.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr Natalii Przybylskiej była adsorpcja ciprofloksacyny na powierzchni nanomateriałów węglowych (nanorurek) oraz dla porównania krzemionkowych, charakteryzacja takiego układu i ocena wpływu na bakterie *E. coli*.

Pierwszą z dwóch głównych części recenzowanej pracy doktorskiej jest obszerna (licząca 50 stron) **Część teoretyczna**, w której cytowane jest 157 pozycji literaturowych spośród łącznie 192 w całej pracy. Zagadnienia omówione i dokładnie tam przedyskutowane obejmują całokształt tematyki wynikającej z tytułu rozprawy. Najpierw dwa króciutkie rozdziały poświęcono podstawowym właściwościom nanocząstek (niecałe 3 str.) oraz matrycom porowatym (niecałe półtorej strony). Cytowanych jest tam 16 pozycji literaturowych. Dalsze dwa znacznie obszerniejsze rozdziały to 3. Materiały i 4. Metody badawcze zastosowane do charakterystyki oddziaływań adsorbent – adsorbat analizowanych układów. W pierwszym z nich – krótszym przedstawione są materiały użyte w badaniach, najpierw należąca do rodziny antybiotyków fluorochinolonowych (FQ) ciprofloksacyna. Pokazana jest i omówiona budowa jej cząsteczki oraz dokładnie mechanizm działania. Dalej przedstawione są materiały spełniające rolę nośników leków, w pierwszej kolejności nanorurki węglowe. Pokazana jest i omówiona ich budowa oraz podział ze względu na liczbę tworzących je warstw (ścian). Omówione są też metody ich syntezy oraz właściwości i zastosowania. Osobny podpunkt dotyczy ich zastosowań w medycynie, szczególnie ich działaniu antybakteryjnym (trzy rysunki – schematy i obszerna tabela).

Dalszy obszerny podrozdział poświęcony jest mezoporowatym materiałom krzemionkowym. Dobrą ilustrację stanowią tu trzy rysunki – schematy. Znacznie krócej (tylko 1,5 strony) niż w przypadku nanorurek węglowych omówione jest zastosowanie materiałów opartych na krzemie w medycynie (tylko 8 pozycji cytowanej literatury i 1 rysunek).

Drugi z najważniejszych rozdziałów Części teoretycznej to 4. Metody badawcze zastosowane do charakterystyki oddziaływań adsorbent – adsorbat analizowanych układów. Jest to 8 metod badawczych, z których część służy także do charakteryzowania właściwości użytych w pracy materiałów (nanorurek węglowych i materiałów krzemionkowych). Są to: pomiar kąta zwilżania, gęstości i lepkości, wyznaczenie niskotemperaturowej izotermy adsorpcji azotu, spektroskopia Ramana, spektroskopia w podczerwieni, skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), mikroskop sił atomowych – AFM, testy mikrobiologiczne.

Dalej następuje **Część eksperymentalna** zawierająca 38 rysunków i 8 tabel. Najpierw krótko przedstawione są obiekty badań – jednościenne nanorurki węglowe (o średnicy 1,7 nm i 30 nm) oraz należąca do rodziny antybiotyków fluorochinolonowych ciprofloksacyna. W pracy stosowane były sporządzone jej wodne roztwory o stężeniach 1 i 2 mg/ml (typowych dla zastosowań klinicznych). Badania rozpoczyna określenie zmian lepkości oraz gęstości tych roztworów w funkcji temperatury (w zakresie 275-315 K). Następnie wyznaczono kąty

zwilżania roztworów ciprofloksacyny dla powierzchni gładkich oraz porowatych materiałów krzemionkowych i węglowych (w tym nanorurek 1.7 i 30 nm). Pomiary prowadzono metodą siedzącej kropli z użyciem tensometru. Obliczono energie zwilżania oraz adhezji. Obserwowana była niewielka energia zwilżania w przypadku SWCNTs (mała zwilżalność powierzchni oraz niska adhezja). W dalszych badaniach, najpierw struktury elektronowej SWCNTs, a następnie oddziaływania nanorurek węglowych z roztworami ciprofloksacyny (CPX) zastosowano spektroskopię Ramana. Badany był stosunek G/D dla SWCNTs z zaadsorbowanym roztworem CPX w funkcji temperatury. Do badania sił pomiędzy ściankami SWCNTs, a wodnymi roztworami CPX wykorzystana została także spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Badane było ustawienie się molekuł CPX w nanorurkach węglowych. Porównywane były widma FTIR wodnego roztworu CPX i CPX zaadsorbowanego w SWCNTs. Uzyskane wyniki FTIR wskazują, że wiązania aktywne kluczowe dla właściwości przeciwbakteryjnych ciprofloksacyny, zachowują swój charakter w warunkach ograniczenia. W szczególności jest to grupa acylowa oraz bardzo aktywne wiązania azotowe. Kolejny podrozdział powinien raczej nosić tytuł Niskotemperaturowa izoterma adsorpcji azotu i powinien być umieszczony zaraz po podrozdziale Przygotowanie próbek. Warto było też zamieścić rysunek z izotermami adsorpcji N_2 w temp. 77 K. W tabeli 7 można było też podać objętości mikroporów V_{mi} (cm^3/g) oraz powierzchnię właściwą BET, co pozwoliłoby porównać wyniki z podawanymi w innych pracach. Dalszy podrozdział Wyniki badań kalorymetrycznych (analiza DSC) bardziej pasowałby po Analizie wyników uzyskanych metodą spektroskopii w podczerwieni. Obiektem badań był wodny roztwór CPX (1 mg/g) oraz dla porównania po zaadsorbowaniu w porach nanorurek węglowych (SWCNTs, 1,7 nm) i krzemionki SBA-15. Wyznaczone zostały temperatury przejścia fazowego i entalpia. Wyznaczone obniżenie temperatury topnienia roztworów CPX zaadsorbowanych w porach w stosunku do cieczy swobodnej było miarą oddziaływań ścianka – ciecz.

Dalsze podrozdziały (5.8 i 5.9) były już poświęcone badaniu uszkodzeń morfologii bakterii (*E. coli*) wywołanych przez nanorurki węglowe z zaadsorbowanym antybiotykiem (ciprofloksacyną).

Analiza zdjęć wykonanych przy użyciu mikroskopu sił atomowych (AFM) wykazała, że adhezja komórek bakterii *E. coli* jest zmniejszona po aplikacji ciprofloksacyny oraz CPX zaadsorbowanej w SWCNTs. Nanorurki węglowe uniemożliwiają bakteriom utworzenie się biofilmu i w związku z tym związane komórki nie przylegają do powierzchni i antybiotyku

może działać na większą ilość komórek. Wskazuje to na możliwość skuteczniejszego działania antybiotyku. W ostatnim badawczym podrozdziale (5.9) przedstawione są wyniki testów na bakteriach *E. coli*. Pierwszym był test oparty na dyfuzji antybiotyku z krążka bibułowego w żelu agarowym. Wyznaczone zostały strefy zahamowania wzrostu dla wodnego roztworu antybiotyku oraz po zaadsorbowaniu go w porach SWCNTs 1,7 i 30 nm. Szczególnie korzystny wynik dało użycie SWCNTs 1,7 nm. Drugą z zastosowanych metod była metoda rozcieńczeń w pożywce. Chodziło tu o określenie najmniejszego stężenia leku (w mg/l, w warunkach *in vitro*), hamującego wzrost bakterii w określonym czasie (wartość MIC - Minimal Inhibitory Concentration). Dla antybiotyku umieszczonego w nanorurkach węglowych wzrost komórek *E. coli* został spowolniony, jednak tempo wzrostu było szybsze niż w przypadku samego antybiotyku, co było spowodowane wolniejszym, lecz długotrwałym uwalnianiem się antybiotyku z porów. Zarówno badania AFM jak i testy mikrobiologiczne potwierdzają skuteczność działania antybiotyku umieszczonego w porach SWCNTs, którego działanie rozpoczyna się po ok. 2 godzinach.

Dalszy rozdział pracy to 6. **Wnioski**. Przedstawione są one w kolejności na ogół zgodnej z przedstawionymi w poszczególnych podrozdziałach Części eksperymentalnej wynikami przeprowadzonych badań. Wynika z nich, że założony cel pracy doktorskiej został zrealizowany.

Lektura rozprawy nasuwa kilka uwag.

Na str. 54 i 55 nie została zacytowana praca [154], mimo że na str. 54 cytowane są prace od [150] do [153], a na str. 55 prace od [155] do [157].

W Bibliografii brakuje cytowanej na str. 28 pracy [88].

Na str. 25 tytuł podrozdziału 3.3. Mezopory krzemionkowe ma chyba przestawione słowa, powinno być 3.3. Krzemionki mezoporowate.

Tytuł podrozdziału 3.2. Nanotuby węglowe nie jest zgodny z terminem nanorurki węglowe, używanym w polskojęzycznej literaturze, a także w tekście zawartym w podrozdziale.

Na str. 91 warto było zaprezentować niskotemperaturowe izotermy adsorpcji-desorpcji azotu dla jednościennych nanorurek węglowych o średnicy 1.7 nm i 30 nm.

Na str. 26 przestawiona jest numeracja rysunków – najpierw jest rys. 11, a potem rys. 10.

W poprzedzającym tekście numeracja jest prawidłowa.

Na str. 55 numer podpisu pod rysunkiem - 28 jest błędny, powinno to być 30. Podobnie na str. 57 powinien być numer rysunku 33, a nie 29. Od tego miejsca numeracja rysunków jest już do końca pracy błędna, dalej numery rysunków są już za niskie (o około 4, 5 lub 6).

Drugi problem to występowanie również od tego miejsca do końca pracy niezgodności numerów rysunków omawianych w tekście i w podpisach pod odpowiednimi rysunkami.

W przypadku tabel wszystko z numeracją jest w porządku.

Dlaczego nie jest cytowana praca: N. Przybylska, M. Śliwińska-Bartkowiak, M. Kościński, K. Rotnicki, M. Bartkowiak, S. Jurga, Confined effect of water solution of ciprofloxacin in carbon nanotubes studied by Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy methods, Journal of Molecular Liquids 336 (2021) 115938. W pracy doktorskiej pochodzi z tego artykułu aż 7 rysunków i 2 tabele.

Powyższe uwagi nie wpływają na całkowicie pozytywną ocenę całości rozprawy. Cel recenzowanej pracy, którym było zbadanie efektywności antybakteryjnej jednościennych nanorurek węglowych z zaadsorbowanym antybiotykiem – ciprofloksacyną został z powodzeniem zrealizowany. Oddziaływanie roztworów ciprofloksacyny z nanorurkami węglowymi zostało wszechstronnie (z użyciem wielu, dobrze wybranych metod) zbadane, a następnie zostały przeprowadzone testy mikrobiologiczne z użyciem bakterii E. coli.

Podsumowując, uważam że przedstawiona do recenzji praca spełnia całkowicie wszelkie ustawowe (art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r.) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Autorka jasno określiła zagadnienia naukowe, które stanowiły cel pracy, a otrzymane w niej wyniki i ich interpretacja znacznie poszerzają dotychczasowy stan wiedzy na temat nowych zaawansowanych układów dostarczania leków, w których wykorzystywane są nanomateriały węglowe.

Zwracam się więc do Rady Naukowej Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie pracy oraz dopuszczenie mgr Natalii Przybylskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam, że ze względu na podjętą tematykę, pomyślnie zrealizowany bardzo obszerny, wielowątkowy program badawczy oraz jakość i perspektywiczną przydatność uzyskanych wyników praca zasługuje na wyróżnienie. Ważnymi cechami rozprawy są zawarte w niej istotne elementy nowości naukowej, jak i potencjalne aspekty aplikacyjne.

Na podkreślenie zasługuje też dorobek publikacyjny mgr Natalii Przybylskiej 2 artykuły w wysoko punktowanych czasopismach wyd. Elsevier: Journal of Molecular Liquids IF=5,3, gdzie jest umieszczona na pierwszym miejscu wśród współautorów oraz Carbon o IF=10,5. Należy też wspomnieć o prezentacji wyników na kilku konferencjach międzynarodowych.

Prof. dr hab. inż. Andrzej Świątkowski