

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

KATEDRA CERAMIKI I MATERIAŁÓW OGNIOTRWAŁYCH

Kraków, dn. 15.08.2023r.

dr hab. inż. Magdalena Ziábka, prof. AGH
Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Ceramiki i Materiałów Ogniotrwałych

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Dominika Sikorskiego** pt. *Chemiczna modyfikacja chitozanu*.

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo pani prof. dr hab. inż. Barbary Błażejczyk-Okolewskiej, przewodniczącej Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach inżynieria mechaniczna, inżynieria materiałowa, z dnia 11 lipca 2023 roku.

1. Tematyka rozprawy i określenie problematyki badawczej

Rozprawa doktorska poświęcona jest badaniom prowadzącym do opracowania nowych materiałów chitozanowych wykazujących działanie biobójcze wskutek ich modyfikacji kwasami organicznymi, jak również ciprofloksacyną. Prezentowana w rozprawie tematyka jest aktualna w świetle zastosowania chitozanu jako biomateriału wykazującego działanie lecznicze i przeciwdrobnoustrojowe. Ze względu na bardzo dobre właściwości biologiczne takie jak: biodegradowalność, brak toksyczności, czy też funkcje stymulujące układ odpornościowy i przyspieszające gojenie się ran, atrakcyjność chitozanu w środowiskach naukowych ciągle rośnie. Chemiczne modyfikacje struktury chitozanu mogą jednak indukować toksyczność tego materiału i mieć negatywny wpływ na jego właściwości. Dlatego też podjęta przez Doktoranta tematyka jest niezwykle interesująca, wartościowa

i bardzo dobrze wpisuje się w obszary badawcze ukierunkowane na ocenę właściwości fizykochemicznych przy równoczesnym uwzględnieniu właściwości biologicznych chitozanu.

2. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 133 strony i została podzielona na 6 rozdziałów. W pracy znajduje się łącznie 40 rysunków i 21 tabel, numerowanych łącznie dla całej pracy. Rozprawę rozpoczynają streszczenia w języku angielskim i polskim oraz kolejno rozdziały przedstawiające przegląd literatury, poprzedzony krótkim wprowadzeniem. Przegląd literatury został podzielony na 8 podrozdziałów. W rozdziale trzecim pracy Doktorant opisuje cel, zakres i hipotezę. Rozdział czwarty dotyczy części eksperymentalnej, natomiast w rozdziale piątym zawarte i omówione zostały wyniki badań. Część eksperymentalna została podzielona na 5 podrozdziałów, w których Autor opisuje użyte materiały i zastosowane metody badawcze, a także omawia wytwarzanie i modyfikacje materiałów chitozanowych. Dysertacja zakończona jest wnioskami, zawartymi w rozdziale szóstym. Na końcu rozprawy znajdują się: spis tabel i rysunków oraz spis literatury naukowej (255 pozycji), z której korzystał Doktorant podczas przygotowania rozprawy.

Tytuł rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Sikorskiego: pt. *Chemiczna modyfikacja chitozanu* jest bardzo ogólny i jasno nie definiuje kierunku badawczego, w którym zmierzał Doktorant, a którym było wykazanie działania przeciwdrobnoustrojowego opracowanych materiałów.

Cel naukowy pracy stanowiło wykazanie skuteczności metod modyfikacji chemicznych włókien oraz folii chitozanowych i określenie wpływu wytypowanych modyfikacji na działanie przeciwdrobnoustrojowe opracowanych materiałów. W oparciu o precyzyjnie sformułowany cel pracy Doktorant postawił hipotezę badawczą skupiającą się na wykazaniu możliwości modyfikacji różnych form chitozanu za pomocą różnych kwasów przy zachowaniu niezmięnionej struktury fizycznej chitozanu ukierunkowanej na poprawę właściwości bakteriostatycznych, którą starał się potwierdzić w wyniku przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Realizację swoich zamierzeń Doktorant skrupulatnie realizował określając sobie cztery cele szczegółowe badań skoncentrowanych na: wytworzeniu materiałów chitozanowych w postaci włókien i folii; modyfikacji materiałów chitozanowych poprzez osadzanie par kwasów na włókninach w celu nadania im właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych; modyfikacji folii chitozanowych poprzez przyłączenie adduktu ciprofloksacyny jako czynnika o działaniu przeciwdrobnoustrojowym

i wreszcie potwierdzenie właściwości strukturalnych badanych materiałów oraz sposobu przyłączania się wyżej wymienionego leku do powierzchni chitozanu.

W przeglądzie literatury Doktorant poruszył zagadnienia związane z charakterystyką polisacharydów, ich podziałem ze względu na budowę i pełnione funkcje oraz omówił ogólnie grupę materiałów biopolimerowych ze względu na ich zastosowanie i właściwości biologiczne. W tej części opisana szczegółowo została chityna, źródła jej naturalnego pozyskiwania z organizmów skorupiaków, mięczaków, owadów i grzybów, a także budowa chemiczna chitozanu z uwzględnieniem trzech form: alfa, beta i gamma oraz charakterystyka ich właściwości fizykochemicznych. W kolejnym rozdziale Doktorant opisuje metody ekstrakcji chityny takie jak: demineralizacja, odbiałczanie, deacetylacja oraz omawia wpływ stopnia deacetylacji na właściwości chitozanu. W kolejnych podrozdziałach tej części pracy Autor skupił się na omówieniu działania przeciwdrobnoustrojowego chitozanu i chityny wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych z uwzględnieniem wpływu różnych czynników takich właśnie jak: stopnia deacetylacji, parametrów pKa i pH kwasów, chelatowania metali oraz masy cząsteczkowej. Następnie Doktorant opisał działanie antybiotyku jakim jest ciprofloksacyna oraz wskazał obszary zastosowania chityny i chitozanu, w tym jako materiały opatrunkowe stosowane w celu gojenia się ran.

Ta część dysertacji stanowi właściwe wprowadzenie do realizacji zaplanowanych prac badawczych i została opracowana w oparciu o 214 pozycji opracowań i artykułów naukowych.

Część eksperymentalną pracy doktorskiej Doktorant rozpoczął od opisu materiałów i odczynników chemicznych zastosowanych w badaniach, a także wymienieniu aparatury pomiarowej. Kolejne rozdziały pracy poświęcone zostały omówieniu sposobów wytwarzania materiałów chitozanowych, w tym włóknin chitozanowych metodą zgrzeblenia i folii chitozanowych metodą odlewania z roztworu. Następnie Autor opisał trzy metody modyfikacji włóknin chitozanowych stosując w tym celu: w metodzie pierwszej nasycanie oparami kwasów solnego, octowego, mrówkowego, propionowego, masłowego i walerianowego, w metodzie drugiej i trzeciej poddając włókniny chitozanowe działaniu kwasu octowego w etanolu wraz z płukaniem w etanolu lub z wykluczeniem procesu płukania. W dalszej części pracy Doktorant opisał również trzy sposoby modyfikacji folii chitozanowych ciprofloksacyną z roztworu NaOH w metodzie pierwszej, z roztworu NaCl w metodzie drugiej i w trzecim przypadku wykorzystując połączenie obydwu sposobów. Wielowątkowe podejście do metody syntezy i modyfikacji materiałów chitozanowych przez

Doktoranta potwierdza Jego skrupulatność w analizowaniu problemu naukowego i dowodzi, że Doktorant wybrał właściwą drogę do osiągnięcia celu badawczego.

W kolejnym podrozdziale części eksperymentalnej pracy nazwanej częścią analityczną Doktorant szczegółowo opisuje sposób przeprowadzenia poszczególnych badań i testów. Autor w bardzo przejrzysty i zwięzły sposób zamieścił informacje dotyczące metodyki badawczej, jak i parametrów które wyznaczał w trakcie pomiarów. Zwracam na to szczególną uwagę, gdyż aktualnie obserwowana tendencja do pomijania dokładnego opisu metodyki badawczej przez doktorantów jest zjawiskiem często występującym. Ta część pracy jest natomiast opisana w sposób dokładny i świadczy o staranności Doktoranta oraz Jego zaangażowaniu w prace badawcze.

W dalszej części dysertacji pan mgr inż. Dominik Sikorski przedstawił i omówił wyniki, które poparł dyskusją odnosząc się przy tym do wyników zawartych w innych pracach naukowych. Na podstawie pomiarów lepkości Doktorant wyznaczył średnie masy molowe chitozanu podczas jego degradacji w różnych kwasach oraz przedstawił zmiany tego parametru w funkcji czasu wykazując tym samym zachodzenie zjawiska degradacji. Badania te doprowadziły Doktoranta do pierwszych ważnych spostrzeżeń i pozwoliły określić wpływ rodzaju kwasu na szybkość degradacji. Następnie na podstawie analizy wyników z analizy chromatograficznej Doktorant wyznaczył średnią liczbowo i wagowo masę molową, polidispersyjność i przedstawił graficznie rozkłady masy molowej dla poszczególnych próbek degradowanych w różnych kwasach. Dzięki dogłębnej analizie degradacji chitozanu Doktorant określił jej mechanizm zachodzenia zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. W wyniku analizy widm NMR Autor wyznaczył stopień deacytelacji chitozanu ulegającemu degradacji w różnych kwasach, co doprowadziło do cennego wniosku, że degradacja w roztworach kwasów organicznych jest wynikiem zerwania wiązań β -1,4-glikozydowych.

W następnym etapie pracy Doktorant za pomocą metody miareczkowania odwrotnego wyznaczył objętość retencji kwasów octowego i solnego, która uzależniona jest od czasu inkubacji chitozanu w atmosferze nasyconej pary kwasu, a jej wartość wzrasta przy zastosowaniu kąpieli dziesięcioprocentowego kwasu octowego w etanolu i eliminacji procesu płukania w czystym etanolu.

Kolejny etap prac pozwolił Doktorantowi na wykazanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej opracowanych materiałów wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Przeprowadzenie powyższych badań potwierdziło zasadność modyfikacji chitozanu parami kwasów, w szczególności zastosowanie 10 % roztworu kwasu octowego w etanolu w celu nadania im funkcji biobójczej. Uzupełnieniem badań

skoncentrowanych na funkcję biobójczą są badania ukierunkowane na sprawdzenie działania toksycznego opracowanych materiałów. Na podstawie oznaczenia procentowego udziału krwinek ulegających hemolizie Doktorant wykazał działanie toksyczne materiału: chitozu modyfikowany parami kwasu octowego na poziomie 21 procent, potwierdzając tym samym, że poprawiając efekt biobójczy należy mieć świadomość występowania działania toksycznego. Ta część pracy jest niezwykle ciekawa i warto byłoby ją kontynuować w oparciu o uwzględnienie innych metod potwierdzających działanie cytotoksyczne opracowanych materiałów.

W kolejnych podrozdziałach dysertacji Doktorant przeprowadził analizę struktury chemicznej opracowanych materiałów w oparciu o metodę badań spektroskopowych FTiR i NMR, na podstawie których potwierdził powstawanie soli chitozanowych na skutek modyfikacji chitozanu poszczególnymi parami kwasów.

W ostatnim etapie części eksperymentalnej Doktorant przeprowadził badania ukierunkowane na modyfikację chitozanu antybiotykiem i nasyconymi parami kwasu octowego zmierzające do uzyskania nowych aktywnych materiałów chitozanowych. W celu potwierdzenia swoich przypuszczeń wykonał badania spektroskopii FTiR, NMR, badania przy użyciu mikroskopu sił atomowych, elektronowego mikroskopu skaningowego, badania chromatograficzne i wreszcie badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Na podstawie wszystkich badań przeprowadzonych w tej części pan mgr inż. Dominik Sikorski doszedł do wniosku, że połączenie obydwu modyfikacji a mianowicie leku i nasyconych par kwasu zapienia najwyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową. Niewielki niedosyt pozostawia brak wykonania badań cytotoksyczności w tej części pracy, jednakże mając na uwadze wielowątkowość pracy, ilość zastosowanych technik badawczych i połączenie oceny właściwości strukturalnych i biologicznych pozostaje mi jedynie skierować uwagę Doktoranta, w którym kierunku kontynuować pracę badawczą.

Całą pracę doktorską pana mgr inż. Dominika Sikorskiego oceniam bardzo pozytywnie, a wnioski do których doszedł systematycznie wykonując prace eksperymentalne uważam za rzeczowe i trafne.

3. Uwagi szczegółowe dotyczące edytorskiej i językowej strony rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana starannie, język jest poprawny, rysunki są czytelne, a układ poszczególnych jej części jest uporządkowany. Autor nie ustrzegł się jednak pewnych błędów literowych, interpunkcyjnych, stylistycznych

i ortograficznych. Ich ilość jednak nie jest znacząca i nie obniża wartości naukowej recenzowanej pracy. Zwracam jedynie uwagę Doktorantowi, że nazwy łacińskie bakterii, jak *Escherichia coli* czy *Staphylococcus aureus*, winny być pisane kursywą. Natomiast wartościowość jonów metali i jednostki centymetrów odwrotnych (analiza widm FTiR) winny być pisane przy zastosowaniu indeksu górnego. Jedną z dwóch uwag edytorskich dotyczy rozmieszczenia opisu do rysunków i tabel w tekście, który zwyczajowo umieszczony powinien być przed omawianym rysunkiem/tabelą. Zachowanie chronologii zdecydowanie ułatwia czytanie i śledzenie wywodów. W sytuacji gdy czytelnik najpierw widzi rysunek, który opisany jest w tekście na kolejnych stronach powoduje pewne zamieszanie i zmusza czytającego do ciągłego przewracania stron. Drugą moją uwagę stanowi brak odniesienia w tekście pracy do rysunków (tak jak to ma miejsce dla rysunków 12, 14-17). Zatem zachęcam Doktoranta aby w przyszłych swoich opracowaniach zawsze sprawdzał by nie pojawiały się rysunki bez odnośnika do tekstu.

4. Uwagi i pytania do Doktoranta

Recenzując rozprawę doktorską mgr inż. Dominika Sikorskiego stwierdzam, że nie posiada ona błędów merytorycznych i została zrealizowana poprawnie. Celowym jednak byłoby zwrócenie uwagi na następujące kwestie:

- 1) W pracy otrzymywane były folie i włókniyny chitozanowe tymczasem nie znalazłam charakterystyki mikrostruktury włókniin. Prosiłabym o komentarz dlaczego nie zostały wykonane obserwacje mikroskopowe potwierdzające faktyczną mikrostrukturę wytworzonych włókniin?
- 2) Na stronach 71-72 pracy Autor pisze, że analiza NMR chitozanu została wykonana przed degradacją i po 168 godzinach prowadzenia procesu degradacji w roztworze kwasu octowego w temperaturze 20°C, tymczasem widma przedstawione na rysunkach 23 i 24 odnoszą się do temperatury 25°C. Prosiłabym o komentarz i wyjaśnienie zaistniałej niezgodności.
- 3) Na stronach 84-87 pracy Doktorant opisuje właściwości strukturalne materiałów chitozanowych na podstawie analizy przeprowadzonej techniką spektroskopii w podczerwieni. Zwracam uwagę Autorowi, że nomenklatura którą stosuje jest niepoprawna, gdyż przy opisie widm używamy terminu pasmo a nie pik.
- 4) W pracy Doktorant naprzemiennie używa terminu „ciprofloksacyna” i „cyprofloksacyna” przy czym poprawną nazwą jest „ciprofloksacyna”.

- 5) W testach oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej folii chitozanowych poddanych działaniu oparów kwasu octowego lub modyfikowanych ciprofloksacyną próbki materiałów zostały poddane procesowi sterylizacji UV przez godzinę z każdej strony. Czy zatem Doktorant sprawdził wpływ takiej długotrwałej sterylizacji na właściwości strukturalne materiałów? Czy taki sposób sterylizacji nie doprowadził do przyspieszenia procesu degradacji badanych materiałów? Zdaniem recenzenta powinna zostać użyta inna metoda sterylizacji.
- 6) Czy zostały wykonane badania uwalniania ciprofloksacyny podczas badań oceny działania biobójczego lub czy w ogóle zostały przeprowadzone badania uwalniania leku w innych testach *in vitro*? Takie badania stanowczo pokazałyby zachowanie się leku w czasie i tym samym dałyby odpowiedź jak długo opracowane materiały wykazują działanie biobójcze.
- 7) W odniesieniu do badań aktywności hemolitycznej przeprowadzonych na ludzkich krwinkach czerwonych prosiłabym Doktoranta o komentarz czy takie badania nie wymagały przypadkiem zgody komisji bioetycznej? Taka informacja powinna znaleźć się w opisie metodyki, jak również istotne byłoby umieszczenie informacji o źródle pochodzenia materiału biologicznego jakim jest krew ludzka.
- 8) Na stronie 81 w opisie tabeli 18 powinno być raczej „toksyczność materiałów mierzona jako % hemolizy krwinek lub % krwinek ulegających hemolizie” a nie „% *hemolizy włóknin*” gdyż to nie włókniny ulegają hemolizie a krwinki.
- 9) Czy według Doktoranta wykazana toksyczność na poziomie 21% dla materiału chitozanowego nasyconego parami kwasu octowego jest bezpieczna dla organizmu ludzkiego i czy taki materiał mógłby być stosowany w przyszłości jako wyrób medyczny?
- 10) Na stronie 104 podpis tabeli 21 powinien raczej zawierać wyniki pomiaru strefy zahamowania wzrostu kolonii bakterii zamiast „wyniki pomiaru narastania kolonii bakterii... ”.

Uwagi te podnoszę z racji obowiązku recenzenta. Dotyczą one szczegółów, które nie wpływają na wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej.

5. Wnioski końcowe

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Dominika Sikorskiego pt. *Chemiczna modyfikacja chitozanu* stwierdzam, że Doktorant w toku prowadzonych badań potwierdził hipotezę badawczą i z powodzeniem zrealizował postawiony w pracy cel naukowy, stawiając przy tym trafne i wartościowe wnioski.

Recenzowana dysertacja doktorska stanowi opis zwięzłego osiągnięcia naukowego i potwierdza wiedzę oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań przez Doktoranta. Co więcej uważam, że przeprowadzone przez Doktoranta badania znacząco poszerzają wiedzę w obszarze dyscypliny inżynieria materiałowa, w szczególności w zakresie chemicznej modyfikacji chitozanu parami kwasów organicznych i ciprofloksacyny w celu poprawy właściwości biobójczych opracowanych materiałów.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymogi Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2021, poz. 478 z późniejszymi zmianami), i wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej w dyscyplinach inżynieria mechaniczna, inżynierii materiałowa o dopuszczenie mgr inż. Dominika Sikorskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Magdalena Ziobko