

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA
Prodziekan ds. Nauki WIMiC

Kraków, 11 lutego 2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr PAULINY ERWARDT
pt. *"Tlenek grafenu jako substancja aktywna
oraz nośnik substancji aktywnych"*

zrealizowanej pod kierunkiem

Promotora Dr. hab. Marka Wiśniewskiego, Prof. UMK
i Promotor pomocniczej Dr hab. Katarzyny Roszek, Prof. UMK

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii UMK oraz
zlecenia Pani Dziekan Prof. dr hab. Iwony Łakomskiej
z dnia 16 grudnia 2021 r.

Od ponad 20 latach nanomateriały węglowe takie jak fullereny, nanorurki węglowe, grafen, tlenek grafenu i inne nanoformy węgla są intensywnie badane w kontekście wykorzystania ich w wielu obszarach takich jak magazynowanie energii, nanokompozyty konstrukcyjne, kataliza a także medycyna. Wciąż jednak otwarte pozostają pytania odnośnie ich wpływu na zdrowie i środowisko.

Pani mgr Paulina Erwardt w swojej pracy doktorskiej podjęła się scharakteryzowania właściwości fizykochemicznych tlenku grafenu, które są ważne z punktu widzenia zastosowań medycznych.

Praca doktorska pani mgr Pauliny Erwardt to cykl jednotematyczny pięciu artykułów, przy czym cztery z nich zostały już opublikowane w recenzowanych, prestiżowych czasopismach anglojęzycznych (*Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Methods in Enzymology, Materials Science and Engineering C, Materials*), a piąty

jest obecnie na etapie recenzji w czasopiśmie *The Journal of Physical Chemistry C*; wszystkie czasopisma są umieszczone na liście *Journal Citation Report* i mają przyznany współczynnik „impact factor” (w zakresie od 1,862 do 4,959; całkowity IF = 17,303). Tematem przewodnim powyższych prac są badania doktorantki nad tlenkiem grafenu i modyfikacją jego właściwości a także opracowanie metod pozwalających na charakteryzację jego właściwości, np. rozwinięcia powierzchni, które jest decydujące, jeśli chodzi o adsorpcję cząsteczek bioaktywnych i ich właściwości biokatalityczne.

Tytuł pracy doktorskiej mgr Pauliny Erwardt *“Tlenek grafenu jako substancja aktywna oraz nośnik substancji aktywnych”* dobrze oddaje treść rozprawy i został właściwie sformułowany.

Wszystkie artykuły zostały wydane w latach 2018-2021; w trzech pracach doktorantka jest pierwszą autorką, a dodatkowo w jednej pracy jest autorką korespondencyjną. Zgodnie z oświadczeniami doktorantki i wszystkich współautorów powyższych prac, jej udział obejmował zwykle przeprowadzenie przeglądu literaturowego (4 prace), współopracowanie koncepcji pracy (4 prace), przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu (wszystkie prace), przeprowadzenie większości eksperymentów w tym syntezę tlenku grafenu, analizę, weryfikację i współinterpretację wyników. Można więc uznać, że udział mgr Pauliny Erwardt w powyższych pięciu pracach był dominujący.

Oprócz załączonych pięciu artykułów, zredagowanych w języku angielskim, streszczenia w języku polskimi i angielskim, oświadczeń wszystkich współautorów, zestawienia dorobku naukowego doktorantki (artykuły, komunikaty konferencyjne, granty, nagrody i wyróżnienia, staże zagraniczne, patent, kursy i szkolenia oraz opis działalności organizacyjnej i popularyzatorskiej), dysertacja zawiera krótkie wprowadzenie (5 stron), cel pracy (1 strona), listę publikacji oraz omówienie problemów badawczych i publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (22 strony) – stanowiące studium literaturowe i odniesienie do badań prowadzonych w ramach

artykułów wskazanych w cyklu publikacji oraz wcześniejszych prac doktorantki. Na końcu tego rozdziału umieszczono spis 61 pozycji literaturowych.

Autorka we wprowadzeniu, w nieco lakoniczny, ale wystarczający sposób nakreśliła najważniejsze zagadnienia dotyczące tlenku grafenu, istotne z punktu widzenia jej dysertacji. Najpierw wymieniła metody otrzymywania tlenku grafenu, począwszy od historycznej metody Brodiego opublikowanej w 1859 r., jej modyfikacji dokonanej w roku 1898 przez Straudermeiera i kolejnych modyfikacji dokonanych przez Hummersona i Offermana a opublikowanych w 1958 r. Następnie przedstawiła opisane w literaturze mechanizmy powstawania tlenku grafenu i wpływu metody otrzymywania na jego budowę chemiczną, rodzaj grup funkcyjnych i ostatecznie na właściwości, takie jak np. stabilność koloidalna i rozwinięcie powierzchni. Doktorantka zwróciła uwagę, że w literaturze nie ma jednoznacznie uznawanej przez środowisko naukowe metody wyznaczania rozwinięcia powierzchni tlenku grafenu. Wykazała, że metody bazujące na izotermach adsorpcji gazów obojętnych takich jak N_2 lub Ar dostarczają danych, które są zaniżone, w porównaniu do badań prowadzonych w fazie ciekłej. Jest to szczególnie ważne, jeśli planuje się wykorzystanie tlenku grafenu jako adsorbentu biomolekuł w celach biokatalitycznych.

Kolejne zagadnienie, które jak wykazała doktorantka, nie jest do końca wyjaśnione w piśmiennictwie, dotyczy takiego doboru metody otrzymywania, aby jak najlepiej kontrolować zarówno wielkość płatków tlenku grafenu, jaki i rodzaj oraz stężenie grup funkcyjnych na jego powierzchni. Ma to istotny wpływ na cytozgodność tlenku grafenu.

Następnie kandydatka do stopnia doktora przedstawiła cel rozprawy doktorskiej, z którego wynika, że skupiła się w niej na pięciu obszarach obejmujących: 1) immobilizację enzymów, 2) adsorpcję różnych związków na tlenku grafenu, 3) opracowanie metody wyznaczania rozwinięcia powierzchni tlenku grafenu w cieczach, 4) określenie mechanizmu oddziaływania lizozymu

z tlenkiem grafenu i 5) opracowanie metody otrzymywania tlenku grafenu o zdefiniowanej wielkości płatków, co ma szczególne znaczenie w jego zastosowaniach biomedycznych. Tematyka ta jest kolejno referowana w artykułach będących podstawą dysertacji.

Wprowadzenie zostało właściwie zredagowane i świadczy o tym, że doktorantka zna najważniejsze pozycje dotyczące omawianej tematyki. Nie ustrzegła się jednak pewnych niefortunnych sformułowań, które przytaczam z obowiązku recenzentki: 1) autorka pisząc nazwiska obcokrajowców zawsze używa na końcu apostrofu, jednak apostrof jest wymagany dla oznaczenia końcówki, gdy jakaś część wyrazu podstawowego nie jest wymawiana (np. jeśli nazwisko kończy się na spółgłoskę np. *Staudenmaier* to w dopełniaczu piszemy *Staudenmaiera*, a nie *Staudenmaier'a* – patrz str. 6, czy *Chena* a nie *Chen'a* – patrz str. 8); 2) autorka używa terminu „pole powierzchni tlenku grafenu”, jednak bardziej odpowiednim terminem byłoby „rozwińnięcie powierzchni” lub „powierzchnia właściwa” (patrz strona 9); 3) autorka użyła aż dwa razy idiomu, który – przynajmniej w moim przypadku wywołał uśmiech na twarzy – mianowicie, że „tlenek grafenu stał się czarnym koniem chemii materiałów węglowych”. I ostatnie pytanie, jakie się nasuwa: czy w kontekście użytym na str. 9 powinno używać się terminu „roztwór wodny tlenku grafenu” czy „zawiesina tlenku grafenu”? Chciałabym prosić, aby w czasie publicznej obrony doktorantka odniosła się do tego ostatniego punktu i zdefiniowała, co rozumie pod pojęciami: roztwór, koloid i zawiesina.

W dalszej części pracy, po rozdziale 2. *Cele i założenia rozprawy doktorskiej* i rozdziale 3 *Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej* jest rozdział 4 *Problemy badawcze i omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*. Takie umiejscowienie ostatniego rozdziału wskazywałoby, że teraz nastąpi opis tego, co znajduje się w artykułach wchodzących w skład doktoratu.

Jednak podrozdział 4.1 *Wykazanie zdolności promieniochronnych GO i zaproponowanie mechanizmu działania przeciw-słonecznego* dotyczy artykułu doktorantki, który opisywał jej wyniki uzyskane w trakcie pracy magisterskiej i moim zdaniem powinien znaleźć się w części literaturowej pracy, przed rozdziałem 2. Podobnie, kolejny rozdział 4.2. *Immobilizacja wybranych enzymów na określenie wpływu interakcji GO-enzym na strukturę białka i aktywność katalityczną* przedstawia wiele wyników doktorantki z jej pracy magisterskiej. Zdaniem moim w tym podrozdziale powinny znaleźć się jedynie wyniki związane z jej doktoratem. Kolejne dwa podrozdziały: 4.3 *Opracowanie skutecznej metody pomiaru pola powierzchni właściwej GO* i 4.4. *Opracowanie nowej metody dostosowania wielkości oraz właściwości GO do potrzeb nanomedycyny* dotyczą już wyników obejmujących pracę doktorską kandydatki. Prezentują one najważniejsze osiągnięcia doktorantki, będące podstawą do przyznania jej stopnia doktora.

W pracy D1 (*Carbonaceous nanomaterials-mediated defense against oxidative stress*, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2020, 20, 294-307) przedstawiony został przegląd literatury na temat właściwości antyoksydacyjnych nanomateriałów węglowych takich jak fulereny i ich pochodne, nanorurki węglowe, kropki kwantowe i tlenek grafenu. Opisano też hipotetyczne mechanizmy, które stoją za tym procesem oraz potencjalne biomedyczne zastosowanie nanomateriałów węglowych.

W pracy D2 (*Chemical and biochemical approach to make a perfect biocatalytic system on carbonaceous matrices*, Methods in Enzymology 2018, 609, 221-245) doktorantka badała immobilizację katalazy na tlenku grafenu i wykazała, że taki układ enzym-podłoże jest bardziej stabilny w podwyższonych temperaturach a także w czasie wielokrotnego użytkowania. Doktorantka na podstawie wyników badań FTIR stwierdziła, że w wyniku immobilizacji dochodzi do niewielkich zmian konformacyjnych w zaadsorbowanej katalazie. Nie stwierdzono spadku aktywności katalitycznej tego enzymu,

a wręcz przeciwnie – jej wzrost. Czy doktorantka mogłaby skomentować, czym można wytłumaczyć taki wynik, skoro zwykle w wyniku immobilizacji dochodzi do spadku aktywności enzymów?

W pracy D3 (*Novel biocatalytic systems for maintaining the nucleotide balance based on adenylate kinase immobilised on carbon nanostructures*, Materials Science and Engineering C 2018, 88, 130-139) doktorantka wykorzystała różne nanoformy węgla (tlenek grafenu, węglowe kropki kwantowe, nanocebulki węglowe) do immobilizacji rekombinowanej kinazy adenylanowej i oceniała jej właściwości katalityczne. Jednak, co należy podkreślić, wcześniej dokonała drobiazgowej analizy budowy badanych nośników za pomocą wysokorozdzielczej mikroskopii elektronowej, spektroskopii Ramana, UV-vis oraz FTIR, a następnie oceniła ich cytotoxycytność z wykorzystaniem komórek z linii CHO. W dalszej części badań oceniła stabilność połączeń enzym-nanomateriał węglowy oraz aktywność enzymatyczną układu. Podobnie jak w przypadku katalazy, i tutaj stwierdzono, że unieruchomienie kinazy adenylanowej na nośnikach węglowych istotnie zwiększa aktywność tego enzymu. Jak wykazały uzyskane wyniki badań *in vitro* szczególnie przydatny do tego celu okazał się tlenek grafenu.

W pracy D4 (*Determination of graphene oxide adsorption space by lysozyme uptake – mechanistic studies*, The Journal of Physical Chemistry C, przesłane do czasopisma 30 września 2021, obecnie w recenzjach) autorka opracowała oryginalną metodę wyznaczania powierzchni właściwej tlenku grafenu za pomocą adsorpcji lizozymu – a więc białka o małej masie cząsteczkowej i stabilnej sztywnej strukturze. W metodzie tej wykorzystała zakres stężeń adsorbentu, który odpowiada tworzeniu się monowarstwy lizozymu na powierzchni tlenku grafenu. Dokonując analizy za pomocą spektroskopii w podczerwieni, oceniając wygaszanie fluorescencji lizozymu w wyniku adsorpcji oraz modelując oddziaływania w badanym układzie: białko – rozpuszczalnik – tlenek grafenu, dostarczyła przekonujących dowodów, że zaproponowana przez nią metodyka wyznaczania powierzchni właściwej tlenku

grafenu jest odpowiednia. Czy doktorantka mogłaby wypowiedzieć się, na jakim etapie jest teraz jej praca – może już została zaakceptowana do publikacji?

W pracy D5 (*A new approach to obtaining nano-sized graphene oxide for biomedical applications*, *Materials* 2021, 14, 1327) doktorantka zaproponowała metodę rozbijania większych płatków tlenku grafenu na mniejsze. Stwierdziła, że odpowiedni czas oddziaływania ultradźwięków na zawiesinę tlenku grafenu w mieszaninie wody i dimetylosulfotlenku pozwala na otrzymanie nanocząstek grafenu o rozmiarze ok. 250 nm, co wykazano za pomocą badań DLS. Tak przygotowane nanocząstki cechowała mniejsza cytotoksyczność niż w kontakcie z niemodyfikowanym tlenkiem grafenu. Chciałabym zaprosić doktorantkę do dyskusji naukowej w czasie obrony jej doktoratu i poprosić o wypowiedź dotyczącą potencjalnej cytotoksyczności nanomateriałów węglowych oraz mechanizmów i zjawisk, jakie za tym mogą stać. W trakcie studiowania wyników tej pracy nasunęło mi się jeszcze jedno pytanie: dlaczego doktorantka pisze, że otrzymany materiał cechuje się tą samą budową chemiczną powierzchni jak materiał niemodyfikowany skoro badania EDX i FTIR wykazały obecność związków siarki próbce? Czy doktorantka mogłaby zaproponować jakie grupy funkcyjne mogłyby powstawać na tlenku grafenu w wyniku oddziaływania z dimetylosulfotlenkiem?

Nie mam istotnych uwag krytycznych do pracy doktorskiej pani mgr Pauliny Erwardt. Przytoczone pytania i sugestie albo są natury redakcyjnej albo stanowią zaproszenie do dyskusji naukowej i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy.

Na podkreślenie zasługuje też, że oprócz pięciu prac będących podstawą dysertacji doktorskiej kandydatka do stopnia doktora jest współautorką 14 innych artykułów z bazy JCR, 3 spoza bazy JCR a także zgłoszenia patentowego. Ponadto zaprezentowała wyniki swoich badań w postaci 2 komunikatów ustnych i 3 plakatowych. Badania doktorantki były finansowane z projektów NCN OPUS

i PRELUDIUM. Tak więc, zarówno zakres prowadzonych badań i osiągnięte wymierne efekty świadczą, że pani mgr Paulina Erwardt może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem, jak na ten etap rozwoju naukowego.

Uważam, że dysertacja doktorska pani mgr Pauliny Erwardt stanowiąca cykl jednotematyczny pięciu artykułów pt. *"Tlenek grafenu jako substancja aktywna oraz nośnik substancji aktywnych"* spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie nauki chemiczne w myśl obowiązującej Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2020 r. poz.85 z późn. zm). W związku z tym wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie pani mgr Pauliny Erwardt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Pomur