

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. Agaty Marii Lange

pod tytułem

„Materiały grafenowe jako nośniki nanocząstek metali o właściwościach antybakteryjnych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Marii Lange została wykonana pod kierunkiem Pana dr. hab. Sławomira Jaworskiego, prof. SGGW w Katedrze Nanobiotechnologii, Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Badania były finansowane z subwencji Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy istotnego zagadnienia związanego z rozwojem innowacyjnych bioaktywnych materiałów mających potencjalne zastosowania w przemyśle oraz ochronie zdrowia. Doktorantka w swojej pracy skupiła się na otrzymaniu materiału grafenowego. Znany jest fakt, że grafen i jego pochodne charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą, co umożliwia skuteczne wiązanie i stabilizację nanocząstek metali, takich jak srebro, miedź czy złoto, które mają właściwości antybakteryjne. Obecnie główne strategie rozwoju wytwarzania bioaktywnych materiałów grafenowych ukierunkowane są na zwiększenie efektywności opracowywanych nośników, zapewniających równomierne rozproszenie nanocząstek i zapobiegając ich agregacji, co jest kluczowe dla długotrwałej skuteczności i stabilności antybakteryjnych właściwości. Właściwości fizyko-chemiczne grafenu pozwalają na syntezę materiałów o wielofunkcyjnych właściwościach, takich jak przewodność elektryczna, elastyczność i biokompatybilność, co otwiera możliwości zastosowań w medycynie, ochronie zdrowia i dezynfekcji powierzchni. Jednocześnie zastosowanie materiałów grafenowych w przemyśle medycznym pozwala zmniejszyć potrzebę stosowania dużych ilości metali, ograniczając potencjalną toksyczność i wpływ na środowisko, przy jednoczesnym zachowaniu skuteczności antybakteryjnej.

Tematyka ocenianej pracy doktorskiej jest zgodna z głównymi trendami badawczymi prac realizowanych w obszarze biomateriałów otrzymywanych na bazie grafenu. Przeprowadzone badania w ramach pracy doktorskiej w szczególności poszerzają stan wiedzy w zakresie interakcji mikroorganizmów z powierzchnią grafenową oraz dostarczają cennych informacji na temat skutecznych, stabilnych i zrównoważonych rozwiązań w walce z mikroorganizmami, co ma kluczowe znaczenie w ochronie zdrowia publicznego i higienie.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Agaty Marii Lange stanowi zbiór trzech oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2022-2024 w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MNiSW. Są to następujące prace:

- 1) **Lange, A.**, Sawosz Chwalibóg, E., Wierzbicki, M., Kutwin, M., Daniluk, K., Strojny-Cieślak, B., Ostrowska, A., Wójcik, B., Łojkowski, M., Gołębiwski, M., Chwalibóg, A., Jaworski, S. (2022). Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating. *Materials*, 15, 1–17. doi:10.3390/ma15093122.
- 2) **Lange, A.**, Sawosz Chwalibóg, E., Daniluk, K., Wierzbicki, M., Małolepszy, A., Gołębiwski, M., Jaworski, S. (2022). Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials. *Nanomaterials*, 12, 1–25. doi:10.3390/nano12173058.
- 3) **Lange, A.**, Kutwin, M., Zawadzka, K., Ostrowska, A., Strojny-Cieślak, B., Nasiłowska, B., Bombalska, A., Jaworski, S. (2024). Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites. *Nanotechnology, Science and Applications*, 17, 303-320. doi:10.2147/nsa.s485841.

Dodatkowo do każdej z wymienionych powyżej prac w dysertacji dołączono oświadczenia współautorów, Promotora oraz Doktorantki opisujące ich udział w opublikowanych pracach. Artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace prezentujące wyłącznie oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka zajmuje miejsce pierwszego autora. Udział Doktorantki w powstaniu w/w artykułów polegał m.in., na zaplanowaniu oraz przeprowadzeniu badań, opracowaniu wyników, przygotowaniu i redakcji manuskryptu. W szczególności, analizy własnoręcznie wykonane przez Doktorantkę dotyczyły pomiaru potencjału Zeta i średnicy hydrodynamicznej, przygotowania preparatów do TEM, wykonania analiz mikrobiologicznych, analizy XTT, analizy MDA, pomiaru reaktywnych form tlenu, czy wykonania pomiaru angiogenezy z wykorzystaniem modelu CAM, pomiaru ATP, wykonania pomiaru poziomu cytokin.

Wiodący udział mgr inż. Agaty Marii Lange w prowadzeniu badań będących podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora jest bezsprzeczny i jest zgodny z deklaracjami pozostałych współautorów oraz informacjami zawartymi w artykułach w sekcji „*Author contributions*”.

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, wykazem skrótów, wprowadzeniem w tematykę rozprawy doktorskiej, prezentacją hipotezy badawczej, celu i zakresu pracy, opisem materiałów i metod zastosowanych w opublikowanych pracach badawczych, opisem układów doświadczeń, omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń. Następnie zamieszczono podsumowanie całości pracy doktorskiej, wnioski oraz bibliografię. Do ocenianej dysertacji dołączono pełne teksty publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora.

Ocena spójności tematycznej zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

Pierwsza z cyklu praca opublikowana w *Materials* opisuje analizy wpływu i działania nanokompozytu tlenku grafenu z dodatkiem nanocząstek srebra oraz jego składowych na dwa gatunki bakterii: *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

W drugiej pracy opublikowanej w *Nanomaterials* Doktorantka dokonała analizy właściwości antybakteryjnych trójkomponentowych nanokompozytów składających się z tlenku grafenu lub grafenu z dodatkiem nanocząstek miedzi i tlenku cynku w stosunku do czterech gatunków bakterii: *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* i *S. aureus*

Z kolei w trzeciej z cyklu pracy Doktorantka skoncentrowała swoje badania na ocenie właściwości wytworzonych nanokompozytów otrzymanych na bazie tlenku grafenu wzbogaconych odpowiednio nanocząstkami srebra, miedzi lub tlenku cynku na formowanie biofilmu trzech gatunków bakterii: *S. aureus*, *S. enterica* oraz *P. aeruginosa*.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że wszystkie załączone publikacje stanowią spójny tematycznie zbiór prac odpowiadający tematowi dysertacji. Dlatego stwierdzam także, że warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska, w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wprowadzenie teoretyczne do tematyki pracy doktorskiej zostało opracowane z zachowaniem standardów typowych dla prac doktorskich. We wstępie omówiono nanomateriały węglowe oraz ich właściwości, jak również zarysowano problem oporności bakterii na antybiotyki. Dodatkowo we wstępie wykazano luki wiedzy oraz potencjalne wyzwania uzasadniające podjęcie realizacji pracy doktorskiej w/w tematyce. W kolejnym

rozdziale zdefiniowano hipotezę oraz cel główny pracy doktorskiej a także określono cele szczegółowe i zakres badawczy poszczególnych prac wchodzących w cykl tematyczny. Główny cel sformułowano w następujący sposób „*określenie potencjalnych właściwości antybakteryjnych nanokompozytów składających się z materiałów grafenowych (GN, GO) dekorowanych nanocząstkami metali (AgNPs, CuNPs, ZnONPs) w stosunku do komórek bakterii gatunków takich jak: S. aureus, P. aeruginosa, S. enterica, L. monocytogenes i E. cloacae oraz określenie mechanizmu ich działania. Ponadto, badania miały na celu określenie właściwości fizykochemicznych wytworzonych nanokompozytów, które mogą mieć wpływ na wywoływaną toksyczność.*”

Podsumowując powyższe stwierdzam, że opisany w dysertacji Pani mgr inż. Agaty Marii Lange cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska. Stwierdzam również, że realizacja tego celu istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

W kolejnych rozdziałach pracy opisano metody badawcze i układy doświadczalne. Rozdział 8 zawiera szczegółowe omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń w ramach poszczególnych etapów pracy doktorskiej (publikacji naukowych będących podstawą ubieganie się o nadanie stopnia doktora).

Należy zaznaczyć, że otrzymane wyniki doprowadziły do szeregu ciekawych odkryć. W pierwszej z cyklu prac zatytułowanym „*Nanocomposites of Graphene Oxide—Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity: Mechanism of Action and Medical Textiles Coating*” Doktorantka przedstawiła kompleksowe badania nad nanokompozytami opartymi na tlenku grafenu oraz nanocząstkach srebra. Doktorantka wraz z pozostałymi autorami szczegółowo przeanalizowała mechanizmy działania otrzymanych materiałów. W ramach tej pracy oceniono także badań właściwości antybakteryjnych czterech różnych tkanin pokrytych nanokompozytem a także badania ogólnej toksyczności wobec modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurczaka. Otrzymane wyniki wskazały, że nanokompozyt tlenku grafenu (zastosowany w stężeniu 5 µg/ml) i nanocząstek srebra (zastosowany w stężeniu 25 µg/ml) wykazuje toksyczne działanie w stosunku do dwóch gatunków bakterii: *S. aureus* i *P. aeruginosa* poprzez zahamowanie ich wzrostu, indukcję produkcji reaktywnych form tlenu, peroksydację lipidów i immobilizację komórek. Doktorantka dowiodła także, że materiały

włókiennicze (bawełna i jedwab) funkcjonalizowane nanokompozytami tlenku grafenu oraz nanocząstkami srebra (w stężeniu tlenek grafenu 5 $\mu\text{g/ml}$ i nanocząstki Ag 25 $\mu\text{g/ml}$) wykazują działanie antybakteryjne oraz nie indukują toksyczności określonej na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury. Należy się zgodzić z Doktorantką, że otrzymane wyniki są obiecujące i mają duży potencjał aplikacyjny, niemniej mechanizm działania nanokompozytu tlenku grafenu oraz nanocząstek srebra na komórki bakteryjne zaproponowany przez Doktorantkę wydaje się zbyt uproszczony.

Zasadne wydaje się tym samym rozwinięcie tej kwestii podczas obrony pracy doktorskiej. W szczególności: co wiadomo o stabilności nanokompozytu tlenku grafenu zawierającego nanocząstki srebra oraz kinetyce uwalniania jonów srebra z tego kompleksu? Czy Doktorantka uważa za słuszne wykorzystania do tego celu technikę ICP-MS? Czy Doktorantka dysponuje danymi lub zna takie, które pokazują porównanie działania przeciwbakteryjnego nanokompozytu tlenku grafenu zawierającego nanocząstki srebra w stosunku np. do AgNO_3 ? Co wiadomo o mechanizmie toksyczności jonów srebra względem układów biologicznych?

W drugiej z cyklu pracy zatytułowanej „*Bacterial Surface Disturbances Affecting Cell Function during Exposure to Three-Compound Nanocomposites Based on Graphene Materials*” Doktorantka dokonała porównania aktywności nanokompozytów wobec wybranych gatunków bakterii. W pracy skoncentrowała swoje badania na pomiarze obniżenia żywotności oraz uszkodzeniach ściany i błony komórkowej, jak również ocenie poziomu wewnątrzkomórkowego ATP. Dodatkowo w ramach tej pracy Doktorantka oceniła zdolność do indukowania przez nanokompozyt fenotypu prozapalnego. Jak zaobserwowano nanokompozyt zawierający tlenek grafenu, nanocząstki tlenku cynku i nanocząstki miedzi (odpowiednio w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ i 25 $\mu\text{g/ml}$) wykazuje działanie antybakteryjne względem czterech gatunków bakterii: *S. aureus*, *S. enterica*, *L. monocytogenes* i *E. cloacae* poprzez obniżenie żywotności oraz przerwanie ciągłości ściany i błony komórkowej, jak również obniżenie zawartości wewnątrzkomórkowego ATP. Doktorantka wskazała także, że powyższy nanokompozyt indukuje fenotyp prozapalny w komórkach linii HFFF2, powodując wzrost poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (TNF- β i TARC). Jest to ważne odkrycie, ponieważ wskazuje na pewne ograniczenia nanokompozytu trójskładnikowego zawierającego grafen, nanocząstki tlenku cynku i nanocząstki miedzi względem komórek człowieka, zwłaszcza komórek płodowych. Chciałbym poprosić o komentarz Doktorantkę, co wiadomo o

zdolności do penetracji skóry lub innych tkanek przez nanocząstki tlenku cynku i nanocząstki miedzi? Na przykład czy znane są Doktorantce badania wskazujące w jakich warstwach tkanki skóry mogą kumulować się nanocząstki tlenku cynku i nanocząstki miedzi?

W ostatniej z cyklu pracy zatytułowanej „*Impaired Biofilm Development on Graphene Oxide-Metal Nanoparticle Composites*” Doktorantka wraz współautorami wykazała, że nanofilmy otrzymywane z wodnych roztworów koloidalnych tlenku grafenu zawierające nanocząstki srebra, miedzi lub tlenku cynku mogą ograniczać formowanie biofilmu przez bakterie takie jak: *S. aureus*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*. Doktorantce z powodzeniem udało się wykazać, że tlenek grafenu może stanowić odpowiednią platformę dla nanocząstek użytych metali, wzmacniając jednocześnie ich przeciwbakteryjne właściwości oraz poprawiając ich stabilność koloidalną, która utrzymuje się w czasie.

W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że zgodnie z zastosowanym układem eksperymentalnym Doktorantka wykazała, że nanokompozyty tlenku grafenu zawierające nanocząstki użytych metali hamują formowanie biofilmu przez bakterie. Do tej części mam następujące pytania: Czy nanokompozyty tlenku grafenu zawierające nanocząstki użytych metali mogą niszczyć strukturę już uformowanego biofilmu przez bakterie? Czy otrzymane nanokompozyty mogą mieć zastosowanie do usuwania biofilmów bakteryjnego pochodzenia? Jaka jest struktura biofilmu tworzonego przez bakterie i co wiadomo na temat biodystrybucji nanomateriałów metalicznych w obrębie biofilmu utworzonego przez bakterie?

Podsumowując, niezależnie od moich pytań uważam, że publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią wartościowy wkład w rozwój stanu wiedzy nauk biologicznych. Praca doktorska poszerza aktualną wiedzę na temat interakcji nanomateriałów z komórkami bakteryjnymi, szczególnie w kontekście zastosowań biomedycznych. Prace eksperymentalne są bardzo dobrze napisane, metodycznie przejrzyste i oparte na rzetelnych badaniach, co czyni je cennym źródłem wiedzy także dla naukowców zajmujących się mikrobiologią medyczną, nanotechnologią, biomateriałami i technologiami tekstyliów medycznych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska **mgr inż. Agaty Marii Lange** spełnia warunki określone w Ustawie Prawo o szkolnictwo wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742). Doktorantka dowiodła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany

problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana przeze mnie praca doktorska istotnie poszerza stan wiedzy w dyscypliny nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie **mgr inż. Agaty Marii Lange** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową otrzymanych przez Doktorantkę wyników o charakterze aplikacyjnym, posiadających bardzo duży potencjał komercyjny w zakresie otrzymanego nanokompozytu wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 06/05/2025



prof. dr hab. Maciej Wnuk,