

dr hab. Teresa Basińska, profesor CBMiM PAN  
Dział Funkcjonalnych Polimerów i Materiałów Polimerowych  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Sienkiewicza 112  
90-363 Łódź  
tel. (42) 6803235  
e-mail: [teresa.basinska@cbmm.lodz.pl](mailto:teresa.basinska@cbmm.lodz.pl)

## **Ocena rozprawy doktorskiej**

**mgr Svyatoslava Nastyshyna**  
**wykonanej na wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej**  
**Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

### ***Smart polymer grafted brushes for biomedical applications***

Przedstawiona do recenzji praca, wykonana pod opieką dr hab. Joanny Raczkowskiej i prof. dr hab. Yuriya Stetsyshyna ma układ klasyczny i obejmuje 99 stron. Rozprawa doktorska składa się ze wstępu, części eksperymentalnej, złożonej z siedmiu podrozdziałów zawierających opisy różnych zagadnień, podsumowania, listy skrótów i spisu literatury, obejmującego 137 pozycji zawierających numery DOI. Z oczywistych względów praca została napisana w języku angielskim, w sposób bardzo poprawny, jasny i logiczny, błędy gramatyczne należą do nielicznych, nie mają wpływu na ogólne, bardzo korzystne wrażenie przy czytaniu rozprawy. Przygotowanie rozprawy w jęz. angielskim jest jej niewątpliwym atutem, gdyż sprzyja poszerzeniu grona czytelników na osoby niepolskojęzyczne, a ponadto, przyczynia się do nawiązania i rozwoju wielostronnych kontaktów naukowych oraz ułatwia dalszy rozwój i karierę naukową.

Zespół na Uniwersytecie Jagiellońskim, w którym prowadzone są badania, już od długiego czasu zajmuje się poznaniem procesów oddziaływań biocząsteczek (białek) z powierzchniami o różnych właściwościach, w tym polimerów i kopolimerów o różnej strukturze i morfologii, a także, badań powierzchni o właściwościach samodezynfekujących się i powierzchniach o niejednorodnej strukturze, np. ze szczepionymi metodą „od powierzchni” polimerami hydrofilowymi i kopolimerami amfifilowymi.

Tematyka badawcza zespołu jest bardzo aktualna i ważna, wiele rozwiązań może znaleźć zastosowanie praktyczne, gdyż prowadzi do wytworzenia materiałów i elementów urządzeń do zastosowań biomedycznych. Korzystając ze zdobytej w trakcie badań wiedzy, w zespole, mogą być opracowane materiały o ściśle kontrolowanych właściwościach, np. odporne na adsorpcję białek, lub selektywnie wiążące biocząsteczki, o właściwościach kontrolowanych zmianą temperatury lub pH środowiska, itp.

Wspomniany zespół badaczy posługuje się też doskonałym, wypracowanym przez lata warsztatem naukowym, wiedzą i zapleczem technicznym, które jest niezwykle przydatne w realizacji postawionych sobie zadań, wyzwań naukowych i generalnie prac poznawczych. Opracowane metody i techniki oraz bardzo dobra aparatura, jak również, doświadczenie badawcze i umiejętności przynoszą wyniki, w postaci prac i badań poznawczych prowadzonych na światowym poziomie, publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu światowym oraz rozwiązań praktycznych.

Przedłożona do oceny praca doktorska p. mgr Nastyshyna wpisuje się bardzo dobrze w ogólny nurt badań powierzchni o niejednorodnej morfologii, w postaci naszczepionych na powierzchnię nowego rodzaju kopolimerów amfifilowych, przygotowanych za pomocą metod syntetycznych.

Praca doktorska jest przygotowana w zwarty i bardzo konsekwentny sposób, czyta się ją łatwo, co świadczy o umiejętności posługiwania się jęz. angielskim bardzo swobodnie i zdolności do jasnego przedstawienia problemu badawczego. Doktorant niejako „prowadzi” czytelnika przez całą rozprawę. P. mgr Nastyshyn postawił sobie ambitny cel – otrzymania tzw. szczotek polimerowych, makrocząsteczek 4-winylopirydyny i/lub eteru metylowego i metakrylanu poli(glikolu etylenowego), chemicznie wbudowanych jednym końcem w podłoże szklane lub naszczepionych na powierzchni nanocząstek nieorganicznych, oraz zbadania właściwości tego typu materiałów pod kątem zastosowań biomedycznych.

Rozprawa rozpoczyna się od krótkiego przeglądu zagadnień poruszanych w poszczególnych częściach rozprawy, przedstawionych w klarowny sposób.

Wstęp jest krótki, ale zawiera potrzebne informacje, które są pomocne w zrozumieniu zagadnień poruszanych w dalszych rozdziałach rozprawy, np. zmiany konformacji szczotek polimerowych poniżej i powyżej temperatury krytycznej, w wypadku polimerów lub kopolimerów o niższej krytycznej temperaturze rozpuszczania; podstawowe informacje na temat podłoży z naszczepionymi szczotkami polimerowymi do hodowli komórkowych i inżynierii tkankowej, a także podłoży antybakteryjnych o właściwościach p/drobnoustrojowych kontrolowanych zmianami temperatury; nanocząstek o budowie typu jądro-powłoka, z powłoką polimerową.

W dalszej części rozdziału opisane są metody syntezy polimerów lub kopolimerów za pomocą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej, takich jak ATRP, RAFT, NMP, oraz opisane są metody badawcze umożliwiające przeprowadzenie charakterystyki powierzchni z wbudowanymi polimerami szczepionymi od powierzchni. Opisy badań zilustrowane przykładami z literatury, przeważnie z kilku ostatnich lat. W tej części brakowało ogólnych schematów reakcji chemicznych, jakie składają się na procesy opisane w tekście. Zwięzłe przedstawienie zagadnień wskazuje na dobrą znajomość najnowszej literatury na poruszane tematy.

W części eksperymentalnej, omówione są kolejne etapy prac zrealizowanych w ramach rozprawy, od opisanie metod wytworzenia powłok polimerowych na podłożach płaskich i nanocząstkach nieorganicznych, poprzez opisy metod instrumentalnych wykorzystanych w badaniach uzyskanych materiałów, dalej po opisy badań podłoży z powłokami polimerowymi i badań nanocząstek organicznych, w celu przeprowadzenia charakterystyk otrzymanych materiałów, a także, opisy badań biologicznych – hodowli komórek, badań przeżywalności komórek i badań biochemicznych komórek po inkubacji na podłożach.

Polimery naszczepione na podłożach wcześniej modyfikowanych (3-aminopropyl)trietoksyloksyanem (skrót APTES) i naniesionym oligonadtlenkiem, będącym inicjatorem polimeryzacji 4-winylopirydyny (pVP), eteru metylowego i metakrylanu oligo(glikolu etylenowego) o różnych stopniach polimeryzacji glikolu (OEGMA) lub kopolimerów VP i OEGMA. W tej części bardzo przydatne są dobrze zrobione schematy postępowania i opisanych procesów chemicznych. Opisy doświadczeń są szczegółowe, umożliwiają powtórzenie badań w innym laboratorium.

Następnie, Doktorant opisał metodę napolimeryzowania VP lub OEGMA na powierzchni nanocząstek krzemionkowych z wbudowanym inicjatorem ATRP. W wypadku kopolimerów, p. mgr Nastyshyn rozważył oczekiwany stosunek segmentów pochodzących z VP i OEGMA w odniesieniu do użytego stosunku komonomerów, stosując równanie Mayo-Lewisa i odpowiednie współczynniki reaktywności. Kolejne podrozdziały poświęcone są wbudowaniu nanocząstek węgla wapnia i nanocząstek srebra w podłoża z polimerami lub kopolimerami w formie szczotek, które są syntetyzowane *in situ*.

Część eksperymentalna jest zakończona obszernym opisem izotermicznej kalorymetrii titracyjnej do badań oddziaływań powierzchni nanocząstek z białkami. W tej części pracy dużo uwagi Doktorant poświęcił opracowaniu metod analitycznych zastosowanych do zbadania właściwości szczotek polimerowych, szczotek polimerowych z wbudowanymi nanocząstkami, a także, nanocząstek nieorganicznych zawierających powłokę polimerową. Uważam, że wybór metod eksperymentalnych był bardzo trafny oraz przygotowane opisy, łącznie z fotografiami aparatury badawczej, świadczą o dobrej znajomości metod analitycznych i umiejętności wyboru zestawu metod do uzyskania odpowiedniej informacji na temat badanych materiałów.

Rozdział III poświęcony jest scharakteryzowaniu podłoży z wbudowanymi łańcuchami polimerowymi w celu wykorzystania w postaci materiałów do hodowli komórkowych. Charakterystyka podłoży z pVP, kopolimerem VP i OEGMA oraz pOEGMA obejmowała badania SIMS-toF, AFM, elipsometrię oraz cykl badań aktywności metabolicznej komórek krwi granulozy i kompleksów oocyte-cumulus zaadsorbowanych na podłożach polimerowych. Rezultaty badań dostarczyły informacji na temat morfologii uzyskanych szczotek, gęstości upakowania łańcuchów polimerowych, grubości warstw polimerowych w stanie suchym i po inkubacji materiałów w wodzie. Analiza ilościowa obu rodzajów

komórek zaadsorbowanych na powierzchniach polimerowych wykazała zmniejszenie liczby komórek na powierzchni pVP i pOEGMA po 48 h inkubacji, natomiast wzrost liczby komórek był obserwowany na powierzchni kopolimeru p(OEGMA-co-VP), co świadczyło o uzyskaniu podłoża sprzyjającego wzrostowi badanych komórek. Ponadto, rezultaty badań wychwytu tlenu wykazały, że w wypadku obu rodzajów komórek, podłoża ze szczotkami z kopolimeru VP i OEGMA spełniają warunki materiału do hodowli komórek przydatnych w zoologii. Z kolei, podłoża ze szczotkami pOEGMA i pOEGMA zawierającymi nanocząstki węgla wapnia zostały zanalizowane pod kątem przydatności do hodowli 3 rodzajów komórek ludzkiej skóry, komórek nowotworowych melanoma i osteoblastów. Wymienione podłoża okazały się niecytotoksyczne wobec komórek prawidłowych skóry i melanoma, oraz reakcja komórek na obecność nanocząstek wskazywała na silną zależność od ich rodzaju.

Podobnie, jak w wypadku wybranych szczotek polimerowych do badań adsorpcji i wzrostu komórek, podłoża ze szczotkami pOEGMA i pVP zawierającymi nanocząstki srebra, zostały wyselekcjonowane przez Doktoranta w celu uzyskania powierzchni o właściwościach bakteriobójczych, kontrolowanych selektywnie zmianami temperatury otoczenia. Aktywność przeciwbakteryjna kontrolowana zmianami temperatury została testowana wobec bakterii Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus*) i Gram ujemnych (*Escherichia coli*). Dodatkowo, zostały przeprowadzone badania przeżywalności i namnażania komórek ludzkich na podłożach ze szczotkami z pOEGMA i pVP zawierających nanocząstki srebra.

Rezultaty badań zależności kątów zwilżania wodą powierzchni polimerowych pOEGMA i pVP, nie zawierających i zawierających nanocząstki srebra, ujawniły termoczulość wszystkich analizowanych podłoży polimerowych. Wymienione warstwy polimerowe wykazały temperaturę krytyczną, powyżej której, kąt zwilżania był znacznie większy i świadczył o wzroście hydrofobowości powierzchni. Ponadto, p. mgr Nastyszyn przeprowadził pełną charakterystykę „szczotek” pOEGMA i pVP na podłożach, zbadał zależność grubości powłoki polimerowej od czasu polimeryzacji, określił temperaturę krytyczną, zbadał morfologię powierzchni szczotek, szorstkość, przed i po osadzeniu nanocząstek srebra za pomocą AFM, a także zbadał samorzutne uwalnianie nanocząstek srebra z warstwy pOEGMA w wodzie. Rezultaty badań wykazały, że jedynie jony srebra uwalniają się z warstw polimerowych w długim czasie, ale ostatecznie nie więcej niż 35 % ich pierwotnej ilości (zmierzonych po 55 dniach inkubacji podłoży ze szczotkami w wodzie).

Doktorant wykazał, że szczotki polimerowe zawierające cząstki srebra wykazały bakteriobójczość wobec bakterii Gram dodatnich i Gram ujemnych w temp. 37°C, czyli temp. wyższej niż temp. krytyczna. Testowane podłoża okazały się nietoksyczne wobec ludzkich komórek skóry w wypadku krótkich czasów ekspozycji. Biorąc pod uwagę potencjalnie duże możliwości wykorzystania podłoży ze szczotkami polimerowymi pOEGMA i/lub pVP z nanocząstkami srebra, w laboratoriach biomedycznych, w postaci powłok powierzchni i sprzętów stosowanych w podwyższonych

temperaturach, jako materiałów biobójczych w temp. 37 °C, uważam, że jest to jedno z najważniejszych osiągnięć pracy p. mgr Nastyszyna.

Ostatni rozdział pracy jest poświęcony badaniom oddziaływań nanocząstek krzemionki z powłoką polimerową z pOEGMA, pVP lub p(OEGMA-co-pVP) z białkami modelowymi, HSA, IgG, fibrynogenem, rozcieńczonym i nierozcieńczonym osoczem ludzkim za pomocą izotermicznej kalorymetrii titracyjnej, w temperaturach poniżej i powyżej temperatury krytycznej każdego polimeru/kopolimeru powłoki nanocząstek. Opisany cykl badań kalorymetrycznych jest bardzo interesujący, gdyż ma duże walory poznawcze i dostarczył wiele nieoczekiwanych wyników. Na przykład, brak oddziaływań Immunglobuliny G wobec powłoki nanocząstek złożonej ze szczotek kopolimeru p(OEGMA-co-VP) w różnych stosunkach molowych w 10 °C, a także, brak oddziaływań IgG z powłoką nanocząstek z pOEGMA w temp. 37 °C, brak oddziaływań fibrynogenu z powłoką z kopolimeru p(OEGMA-co-VP) w stosunku 1:3, podczas gdy przy innych stosunkach molowych tych kopolimerów, interakcje IgG z nanocząstkami miały miejsce. W wypadku analizowanych białek, adsorpcja na nanocząstkach z powłoką z kopolimeru pOEGMA-co-pVP zachodziła w procesie entropowym lub entalpowym ze wzrostem udziału winylopirydyny w kopolimerze i wzrostem hydrofobowości powierzchni, w temp. 37 °C, tj. powyżej temp. przejścia fazowego. Z kolei, ta sama powłoka polimerowa była podatna na adsorpcję białek w wypadku mieszaniny białek osocza ludzkiego, w przeciwieństwie do układu nanocząstki-białko, w którym stosowano pojedyncze białka.

Mimo mojej bardzo pozytywnej opinii o pracy, muszę zwrócić uwagę na pewne zauważone niedociągnięcia. Zgodnie z nomenklaturą opracowaną przez IUPAC i zawartą w tzw. Purple Book IUPAC (wyd. R.G. Jones, J. Kahovec, R. Stepto, E.S. Wilks, M. Hess, T. Kitayama, W. Val Metanomski. Compendium of Polymer Terminology and Nomenclature, IUPAC Recommendations 2008, RSC Publishing, IUPAC 2009) terminem "polimeryzacja żyjąca" (p. 3.21, str. 39) określa się polimeryzację łańcuchową, w której przeniesienie łańcucha i zakończenie łańcucha są nieobecne. Zatem, jak podano w pracy, terminem tym nie można określić kontrolowanych polimeryzacji rodnikowych typu ATRP i innych, w których, w trakcie procesu następuje czasowa terminacja propagujących łańcuchów. Ponadto, mimo pełnego zbadania właściwości uzyskanych „szczotek polimerowych” szczepionych na podłożu, uzyskane polimery i kopolimery nie zostały scharakteryzowane ze względu na liczbowo i wagowo średnie masy molowe i rozrzut mas molowych (tzw. współczynnik dyspersji). Przybliżone dane można uzyskać, prowadząc polimeryzację w roztworze, w tym samym naczyniu reakcyjnym, w którym uzyskano łańcuchy polimerów wbudowane jednym końcem w podłoże. Masy molowe pVP, p(VP-co-OEGMA) i pOEGMA zostały umieszczone na str. 40 rozprawy, jednakże bez dodatkowego komentarza o sposobie oznaczenia mas molowych i ich rozrzutu. Udział molowy komonomerów w kopolimerze i dane dotyczące mikrostruktury makrocząsteczek można było uzyskać z analizy

odpowiednio, widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  magnetycznego rezonansu jądrowego. W pracy byłyby także przydatne wzory chemiczne struktur uzyskanych polimerów i kopolimeru p(VP-co-OEGMA).

Podsumowując, rezultaty badań objęte rozprawą wnoszą cenny wkład w wiedzę o materiałach w tym, o podłożach ze szczotkami polimerowymi, przydatnymi do wielu zastosowań biomedycznych, aktywnie odpowiadających na bodźce otoczenia.

Praca jest nowatorska, nie tylko ze względu na zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowego kopolimeru i przygotowanie warstw polimerowych w postaci szczotek na podłożu stałym, ale także ze względu na zastosowanie całego spektrum metod analitycznych, SIMS-toF, XPS, AFM, SEM, elipsometrii, goniometrii, izotermicznej kalorymetrii titracyjnej (ITC), umożliwiających pełne scharakteryzowanie nowo wytworzonych powłok polimerowych na podłożu stałym i nanocząstkach krzemionki, także w obecności biocząsteczek lub komórek.

Sposób przeprowadzenia całych cykli badań świadczy o dużych umiejętnościach podejmowania trudnych wyzwań naukowych i projektowania cyklu badań prowadzących do uzyskania wielu cennych informacji o badanych układach, a także dużej staranności i zwracaniu uwagi na szczegóły.

Zaproponowane rozwiązania mogą przynieść konkretne korzyści w postaci zastosowań biomedycznych podłoży ze szczotkami, jak i nanocząstek z powłoką polimerową.

Bardzo dobry warsztat pracy badawczej, a więc bardzo dobra umiejętność wykorzystania metod i technik badawczych do zrealizowania celu pracy, poparte współpracą między-zespołową (praca wymagała przeprowadzenia kilku cykli badań biologicznych), dały bardzo dobre rezultaty. Uzyskane wyniki dotyczące zagadnień rozwiązanych w toku pracy doktorskiej zostały opublikowane w kilku artykułach, w czasopismach naukowych o zasięgu ogólnoświatowym, o wysokim i bardzo wysokim współczynniku oddziaływania (Impact Factor). Doktorant jest współautorem 6 publikacji dotyczących bezpośrednio rozprawy, w 3 z nich jest pierwszym autorem. W opublikowanych pracach wkład Doktoranta jest znaczący. W dorobku ma jeszcze 3 dodatkowe prace niewchodzące bezpośrednio w skład rozprawy. Łączny IF wszystkich prac wynosi 42,551, a średni IF/pracę wynosi 4,727.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty ocenianej pracy, stwierdzam, że rozprawa doktorska pana mgr S. Nastyshyna spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2020 r. poz.85 z późn. zm.) i zgłaszam pracę do wyróżnienia. Z pełnym przekonaniem pozwalam sobie zaproponować Radzie Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, aby na podstawie przedłożonej rozprawy, dopuścić pana magistra Svyatoslava Nastyshyna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Łódź, 13.12.2022.