

Dr hab. inż. Zygmunt Zander, prof. UWM
ul. W. Szczekin-Krotowa 17
10-759 Olsztyn
zygmunt.zander@gmail.com

Olsztyn, dnia 12 kwietnia 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej p.t.:

„Badanie molekularnych mechanizmów wiązania metali z białkami”
wykonanej przez **mgr Oleksandrę Pryshchepa**
w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na Wydziale Chemii
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor pracy: **dr hab. Paweł Pomastowski, prof. UMK**

Informacje ogólne

Tekst pracy obejmuje 185 stron wydruku. Jej struktura jest dość oryginalna i składa się z siedmiu rozdziałów, stanowiących meritum rozprawy na stopień doktora oraz czterech rozdziałów dodatkowych zawierających streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz oświadczenia współautorów publikacji.

W napisanych po polsku rozdziałach 1. ÷ 4. Doktorantka prezentuje uzasadnienie wyboru laktoferyny (LTF) jako przedmiotu badań i omawia jej właściwości fizykochemiczne oraz biologiczne ze szczególnym zwróceniem uwagi na kompleksy LTF z jonami metali. Ta część pracy prezentuje również metody badawcze zastosowane w badaniach chemicznych i fizykochemicznych laktoferyny oraz jej kompleksów z jonami metali, przy czym czytelnik jest odsyłany do odpowiednich artykułów w rozdziale 6. p.t. „Publikacje naukowe” Materiał zawarty w rozdziałach 1. ÷ 4. został opracowany w oparciu o dane literaturowe obejmujące 85 pozycji piśmiennictwa.

Polskojęzyczną część wprowadzającą zamyka rozdz. 5., w którym sformułowano cel podjętych badań z wyszczególnieniem zastosowanych metod analitycznych. Jako główny cel rozprawy wskazano przeprowadzenie syntezy kompleksów LTF z jonami srebra, żelaza(III) i cynku oraz dokonanie opisu mechanizmów ich wiązania na podstawie przeprowadzonych analiz z wykorzystaniem m.in. metod modelowania molekularnego, jak również ocenę właściwości otrzymanych kompleksów pod kątem oddziaływania cytotoksycznego i biobójczego. W polskojęzycznych opisach właściwości laktoferyny i wyników przeprowadzonych analiz czytelnik jest odsyłany do odpowiednich publikacji oryginalnych, stanowiących podrozdziały 6.1. ÷ 6.5.

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy syntezy kompleksów i nanokompozytów laktoferyny z jonami srebra, żelaza(III) oraz cynku. Podjęta tematyka jest oryginalna i nowatorska, a osiągnięcie założonych celów wymagało zastosowania szeregu zaawansowanych, instrumentalnych metod analitycznych oraz obliczeniowych. Należy przy tym podkreślić, że dysertacja Pani mgr Oleksandry Pryshchepa została wykonana w ramach realizacji projektów badawczych prowadzonych w interdyscyplinarnych zespołach złożonych z wykonawców afiliowanych w różnych instytucjach naukowych.

Podział materiału na rozdziały jest przejrzysty i zawiera wszystkie elementy poprawnie zredagowanej pracy doktorskiej – tzn. wyróżnia się część teoretyczną obejmującą nakreślenie problemu w oparciu o przegląd piśmiennictwa, sformułowanie celu oraz zakresu badań eksperymentalnych. Wyniki pomiarów, analiz i obliczeń wraz ze szczegółową prezentacją metodyki badawczej w poszczególnych artykułach, jak również analiza uzyskiwanych wyników i ich dyskusja zostały należycie udokumentowane w rozdziale 6. zatytułowanym „Publikacje naukowe”. Rozdział ten jest złożony z pięciu, tematycznie powiązanych anglojęzycznych artykułów naukowych, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, tj.: *Adv. Colloid & interface Sci.*, *Int. J. Mol. Sci.*, *Sci. Reports*, *J. Dairy. Sci.*, *J. Mol. Structure*. Czasopisma te posiadają wysokie wartości współczynnika wpływu ($IF = 3,84 \div 15,19$; $70 \div 200$ pkt. MEN). Pani mgr Oleksandra Pryshchepa jest pierwszym autorem w czterech z pięciu artykułów wyodrębnionych z dorobku i włączonych do dysertacji.

Całość dysertacji uzupełniają: *Podsumowanie i wnioski* w języku polskim (rozd. 7.), *Streszczenie* (rozd. 8.), *Abstract* (rozd. 9.), *Dorobek naukowy* Doktorantki (rozd. 10.) i rozdział 11. zawierający anglojęzyczne *Oświadczenia* współautorów publikacji zamieszczonych w rozdz. 6. Oświadczenia współautorów są dość ogólnikowe i nie w każdym przypadku można jednoznacznie ocenić wiodący wkład Doktorantki w opracowanie pierwszej wersji tekstu artykułu.

Ocena rozprawy doktorskiej

Zasadnicza część dysertacji oparta jest na pięciu artykułach naukowych opublikowanych w latach 2020 – 2023. Pierwszy z cyklu 5 artykułów podrozdział 6.1. należy zaliczyć do części teoretycznej rozprawy, gdyż stanowi on obszerny, 30-stronicowy artykuł przeglądowy opracowany na podstawie 255 pozycji piśmiennictwa i poświęcony prezentacji zagadnień dotyczących problematyki podstawowych zagadnień związanych z otrzymywaniem nanocząstek srebra i charakterystyką ich właściwości. W artykule

opisano metody syntezy nanocząstek, fizyczne i fizykochemiczne techniki ich badania, podstawowe właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną. Podano również przykłady sterowania podstawowymi właściwościami nanocząstek, jak ich rozmiar i kształt. Zaprezentowany materiał świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym. Doktorantki do prowadzenia badań na procesami kompleksowania laktoferyny z jonami metali. W opracowaniu zamieszczono też aktualne informacje dotyczące rozwoju nanotechnologii, bezpiecznych oraz zrównoważonych sposobów aplikacji nanocząstek srebra przy tworzeniu innowacyjnych produktów i materiałów.

Prace eksperymentalne polegające na otrzymywaniu kompleksów laktoferyny (LTF) z jonami srebra, żelaza(III) i cynku oraz badaniu ich właściwości zostały zaprezentowane odpowiednio w rozdziałach 6.2 ÷ 6.5. Przedmiotem badań w publikacjach 6.2 ÷ 6.4 była laktoferyna z mleka krowiego (ang. *bovine milk lactoferrin* – bLTF), natomiast w publikacji 6.5. zastosowano rekombinowaną laktoferynę ludzką (ang. *recombinant human lactoferrin* – hLTF).

Rozdział 6.2. prezentuje wyniki syntezy kompleksów LTF z jonami srebra prowadzonej w trybie procesu okresowego. Na podstawie parametrów izoterm sorpcji stwierdzono spontaniczny charakter wiązania jonów Ag^+ z białkiem i uzależnienie mechanizmu adsorpcji od stężenia jonów metalu w układzie. Właściwości otrzymanych kompleksów badano z wykorzystaniem szeregu metod analitycznych stwierdzając występowanie różnych mechanizmów wiązania. Ważnym osiągnięciem ocenianej pracy jest stwierdzenie, że kombinacja LTF ze srebrem wykazuje wyraźny efekt synergistyczny i biologiczna aktywność kompleksów $AgLTF$ jest większa niż samych jonów Ag^+ .

W kolejnej publikacji (rozdz. 6.3.) zaprezentowano wyniki badań przebiegu wysycania laktoferyny jonami żelaza $Fe(III)$. Podobnie, jak w przypadku wiązania jonów srebra z LTF, reakcję między białkiem i jonami żelaza śledzono na podstawie analizy przebiegu izoterm sorpcji. Wykazano, że proces adsorpcji jonów żelaza do powierzchni molekuł LTF może przebiegać w sposób złożony, przy czym powstawanie kolejnych warstw sorpcyjnych wymaga coraz większego stężenia jonów żelaza(III) w układzie. Pozwoliło wytypować stężenie 600 mg/L jako optymalne do syntezy stabilnych kompleksów. Strukturę i właściwości otrzymanych kompleksów oceniano na podstawie zaawansowanych metod analiz instrumentalnych konkludując potrzebę prowadzenia dalszych badań.

Z kolei w rozdziałach 6.4. i 6.5. zamieszczono wyniki badań nad kompleksowaniem laktoferyny z jonami cynku. Stosowano LTF pochodzącą z mleka krowiego (bLTF) – w rozdz. 6.4. i rekombinowaną laktoferyną ludzką (ang. *human lactoferrin* - hLTF) – w rozdz. 6.5. Wykazano, że proces wiązania LTF z jonami cynku wymaga innych parametrów środowiska niż w przypadku kompleksowania białka z jonami srebra czy żelaza. Stwierdzono przy tym możliwość wypierania jonów żelaza przez jony cynku i znaczący wpływ stężenia jonów cynku w roztworze. Analizy spektroskopowe zastosowane do badania kompleksów laktoferyn z jonami cynku wskazywały, że reakcja kompleksowania prowadziła do zmian zawartości innych metali w układzie. Jednocześnie stwierdzono, że sposób wiązania jonów metali z białkiem był niezależny od rodzaju LTF zastosowanej w eksperymentach.

Rozprawę zamyka rozdział 7. pt.: „Podsumowanie i wnioski”. Doktorantka wymienia tu trzy wnioski, dość niefortunnie nazwane „postulatami”, które odnoszą się do całokształtu badań przedstawionych w publikacjach składających się na rozdział 6. Są to najważniejsze konkluzje wynikające przeprowadzonych badań i trafnie zostały wyeksponowane. Odczuwa się jednak brak uogólniającego wniosku odnoszącego się do problemu mechanizmów wiązania metali z białkami, sygnalizowanego w tytule rozprawy.

Z kolei na podsumowanie całości składają się streszczenia poszczególnych artykułów omówionych już w rozdziale 3.

W odniesieniu do całości ocenianej dysertacji należy stwierdzić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki dobrej znajomości problematyki budowy i chemii białek oraz stosowania szerokiego wachlarza nowoczesnych, instrumentalnych metod badania właściwości otrzymywanych kompleksów białka z jonami metali. Zasygnalizowane w publikacjach biobójcze oddziaływanie kompleksów LTF z jonami metali zasługuje na prowadzenie dalszych badań w tym kierunku. Wyniki z ocenianej dysertacji wskazują na duże prawdopodobieństwo otrzymania w przyszłości nowych preparatów o unikalnych właściwościach, np. suplementów diety, powłok opakowań produktów spożywczych, leków lub materiałów opatrunkowych.

Przy ogólnie wysoce pozytywnym odbiorze dysertacji nasuwają się nieliczne uwagi krytyczne:

- oświadczenia współautorów publikacji są dość ogólnikowe i nie w każdym przypadku można jednoznacznie ocenić wiodącą rolę Doktorantki w przygotowaniu pierwszej wersji artykułu;

- fotografie mikroskopowe obrazujące strukturę nanokompleksów są nadmiernie zmniejszone do potrzeb publikacji, przez co są mało czytelne. W dysertacji na stopień Doktora mogłyby jednak być zamieszczone w odpowiednim formacie, np. jako Appendix, wówczas ich czytelność byłaby o wiele lepsza.

Podsumowanie

Od strony formalnej rozprawa Pani mgr Oleksandry Pryshchepa napisana jest na ogół poprawnym językiem naukowym – nieliczne błędy w nazewnictwie i gramatyczne nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Praca zawiera bardzo bogaty materiał eksperymentalny i analityczny. Dyskusja wyników analiz jest wnikliwa i przekonująca. Doktorantka wykazała się w niej umiejętnością:

- sformułowania ważnego i aktualnego problemu badawczego,
- planowania eksperymentów i ich przeprowadzenia,
- doboru właściwych metod analitycznych,
- wnikliwej analizy i interpretacji uzyskiwanych wyników,
- poprawnego wnioskowania.

Oceniana dysertacja świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego prowadzenia prac badawczych w zakresie chemii i modyfikacji białek pod kątem wykorzystania ich zdolności do wiązania się z jonami metali i do opracowywania nowych produktów oraz materiałów do zastosowań praktycznych. Przekonanie to buduję na podstawie oceny Jej dorobku obejmującego 10 pozycji opublikowanych w przeważającej większości w czasopiśmie z IF, nie licząc 5 publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej. Ważne jest też, że Doktorantka wypełnia zadania popularyzujące Jej obszar badań poprzez uczestnictwo w 15 konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych. Duże znaczenie dla kształtowania osobowości naukowej Doktorantki ma także Jej zaangażowanie w realizację 6 grantów, przy czym w 5 z nich pełniła funkcję kierownika. Na podkreślenie zasługuje również Jej umiejętność pracy w zespole oraz dokonywania krytycznej oceny otrzymywanych wyników analiz i ich konfrontacji z danymi dostępnymi w piśmiennictwie.

W moim przekonaniu dysertacja Pani mgr Oleksandry Pryshchepa zawiera szereg elementów nowości i spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora nauk chemicznych. Wobec powyższego wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Oleksandry Pryshchepa do dalszych etapów postępowania

doktorskiego zgodnie z Ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20. 07. 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Jednocześnie stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy biorąc pod uwagę jej wysoki poziom i dorobek naukowy Doktorantki. Uzasadnienie merytoryczne wniosku jest zawarte w „Podsumowaniu” recenzji.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Szymon Ławski', is positioned to the right of the main text block.