



POLITECHNIKA POZNAŃSKA



dr hab. inż. Jakub Zdarta, prof. PP
Wydział Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3720, fax +48 61 665 3649
e-mail: Jakub.Zdarta@put.poznan.pl

Poznań, 29.11.2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Anny Rodzik

pt.: „Badanie mechanizmów tworzenia nanokompozytów metal-białko jako potencjalnych środków przeciwdrobnoustrojowych”

opracowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Anny Rodzik została zrealizowana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky oraz w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem prof. dra hab., dr h.c. multi Bogusława Buszewskiego, czł. rzecz. PAN – wybitnego specjalisty w zakresie chemii analitycznej, bioanalitycznej i środowiskowej, jako promotora oraz pod opieką dra hab. Pawła Piotra Pomastowskiego, prof. UMK, jako promotora pomocniczego.

Zakres prezentowanej pracy w ogólnym zarysie dotyczy charakterystyki procesów wiązania jonów cynku i srebra do układów białkowych wraz ze zdefiniowaniem mechanizmów tych procesów, wnikliwą charakterystyką powstających metalokompleksów i nanokompozytów, jak i próbą wskazania ich praktycznego zastosowania.

Oceniając przedłożoną rozprawę doktorską brano pod uwagę przede wszystkim oryginalność i nowatorski charakter zrealizowanych prac, aktualność tematyki badawczej, trafność wyboru problemu badawczego, metodologię badań, dobór wykorzystanych metod oraz technik analitycznych, jak również poprawność interpretacji uzyskanych wyników oraz przeprowadzonej dyskusji, także w świetle aktualnego stanu wiedzy, a także skuteczność osiągnięcia założonego celu badań. Istotny aspekt, aczkolwiek nie determinujący całościową ocenę stanowiły także osiągnięcia naukowe Doktorantki.

Białka stanowią podstawowy budulec wszystkich organizmów żywych i są niezbędne do ich prawidłowego funkcjonowania. Dlatego, pomimo relatywnie dobrego poznania i opisanie funkcji białek, stale prowadzone są zaawansowane prace związane z ich zaawansowaną charakterystyką, opracowaniem nowych technik ich analizy, a także możliwościami ich modyfikacji i zmiany właściwości, pod kątem nadania nowych funkcjonalnych cech. Pod tym kątem szczególnie istotne wydaje się wykorzystanie szeroko dostępnych białek, jak np. białka mleka i ich połączenie z innymi substancjami, jak np. jony metali, czy małe związki organiczne, celem wytworzenia układów biokoloidalnych o pożądanym właściwościach. W zależności od rodzaju zastosowanego modyfikatora substancje takie mogą wykazywać działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwwgrzybicze, a także mogą

wspomagać np. gojenie ran. Istotne pod tym kątem są badania bioaktywności nowo-syntezowanych struktur celem oceny ich potencjalnego zastosowania jako środków terapeutycznych oraz analiza toksyczności i negatywnego wpływu tych substancji na organizmy żywe. Chodzi bowiem nie tylko o stworzenie efektywnego układu, ale przede wszystkim opracowanie substancji o znikomym negatywnym wpływie na komórki żywe. Szczególną rolę w tym aspekcie odgrywają techniki modelowania molekularnego, które umożliwiają nie tylko modelowanie otrzymywanych struktur i opisanie mechanizmów formowania się wspomnianych układów, ale też wspomagają przewidzenie ich właściwości, poprzez szczegółowy opis mechanizmu wiązania modyfikatora z białkiem. Z kolei dostępność i różnorodność stosowanych substancji dopujących białko, wpływają na uniwersalność metody i decydują o jej istotnej roli. Można zatem podsumować, że stały postęp związany z możliwością modyfikacji białek, a także koncepcja projektowania ich właściwości oraz cech funkcjonalnych stwarza możliwość konstruowania zaawansowanych systemów o właściwościach terapeutycznych i leczniczych. Konsekwencją tego jest dalszy rozwój prac i coraz powszechniejsze stosowanie funkcjonalizowanych białek. Jednak dobór odpowiedniego czynnika modyfikującego, wnikliwa ocena przeprowadzonego procesu, jak i finalna ocena właściwości wytworzonych układów, stanowią ciągle wyzwania, które muszą zostać wnikliwie przeanalizowane przy projektowaniu wspomnianych układów.

W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się tematyka dysertacji doktorskiej Pani mgr Agnieszki Rodzik, co jednoznacznie wskazuje na jej istotność i aktualność, a także na znaczny potencjał opracowanych w pracy systemów. Celem zrealizowanej pracy było przeprowadzenie procesu syntezy/immobilizacji jonów cynku oraz jonów srebra przez białka mleka, w tym kazeinę oraz β -laktoglobulinę, wnikliwa ocena mechanizmów tworzenia się układów metal-białko oraz zaawansowana charakterystyka ich właściwości pod kątem możliwości praktycznego zastosowania. Interesujące wydaje się wykorzystanie rozpowszechnionych w naturze białek obecnych w mleku, jako wyjściowego materiału, który poddawany jest modyfikacjom celem otrzymania funkcjonalnych układów oraz wieloaspektowa charakterystyka wytworzonych materiałów ze szczególnym uwzględnieniem oceny mechanizmu formowania się tych związków, co umożliwia ich precyzyjną syntezę. Podejście takie, poza znamionami nowości naukowej, ma także interdyscyplinarny charakter, bowiem łączy zagadnienia z pogranicza chemii analitycznej, nauki o materiałach, biotechnologii, a nawet inżynierii medycznej. Zwłaszcza włączenie w badania aspektów ostatniej z wymienionych dziedzin zasługuje na podkreślenie, bowiem nadaje przeprowadzonym badaniom silny aspekt praktyczny, związany z zastosowaniem opracowanych materiałów jako środków wspomagających gojenie ran. Ponadto zaprezentowanie w rozprawie informacji związanych z wykorzystaniem nanokompozytów w procesie gojenia ran z wykorzystaniem modelu zwierzęcego (myszy) dobitnie wskazuje nie tylko na wysokim poziomie przedkładanej dysertacji, ale także na kompleksowe podejście do realizacji tematu i celu badań, począwszy od syntezy i charakterystyki układów, co wnosi aspekt naukowy, po ich praktyczne zastosowanie.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Rodzik jest napisana w języku polskim i ma formę spójnego zbioru ośmiu artykułów naukowych (oznaczonych jako P1-P8) indeksowanych w zdecydowanej większości (poza pracą P1) przez *Thomson Reuters Journal Citation Reports*. Siedem z pośród wymienionych artykułów zostało już opublikowanych i posiada pełne dane bibliometryczne, natomiast ostatni z uwzględnionych artykułów został załączony do czasopisma i jest w trybie ewaluacji. Sumaryczny *Impact Factor* tych prac, z roku

opublikowania, wynosi 33,028, a suma punktów ministerialnych, zgodnie z obowiązującym wykazem czasopism, równa się 720. Rezultaty przeprowadzonych badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, m.in. takich jak *Colloids and Surfaces A*, *International Journal of Biological Macromolecules*, *Journal of Molecular Structure* czy *Scientific Reports*. W siedmiu spośród tych prac Doktorantka jest pierwszym autorem, a zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami, dominujący udział Pani mgr Agnieszki Rodzik w przygotowywaniu wszystkich wymienionych w spisie prac nie budzi najmniejszych wątpliwości. Przekłada się to bezpośrednio na stwierdzenie, że zamieszczona w pracy dokumentacja jest odpowiednia i również nie budzi najmniejszych wątpliwości.

Główną część analizowanej rozprawy stanowi swoisty przewodnik po artykułach naukowych stanowiących monotematyczny cykl prac składający się z Wprowadzenia (Rozdział 1), Celu badawczego (Rozdział 2), opisanie Problemu badawczego (Rozdział 3) w którym opisano aktualny stan wiedzy, przedstawiono uzyskane wyniki badań, jak i przedstawiono zawierającą 104 pozycję bibliografię, które jest aktualna i odpowiednio dobrana. Tę część pracy zwieńcza Rozdział 4 pod tytułem Publikacje naukowe, który zawiera oryginały artykułów stanowiących podstawę monotematycznego cyklu oraz Podsumowanie i wnioski (Rozdział 5). Kolejne części pracy to Streszczenie w języku polskim (Rozdział 6), *Abstract* w języku angielskim (Rozdział 7), Dorobek naukowy (Rozdział 8) oraz kopie stosownych oświadczeń (Rozdział 9 Oświadczenia).

Układ przedłożonej do recenzji pracy jest klasyczny, w odniesieniu do rozpraw przedstawianych jako zbiór artykułów powiązanych ze sobą tematycznie, aczkolwiek zawiera pewne elementy nowości jak np. połączenie wstępu teoretycznego z bezpośrednim odniesieniem i dyskusją uzyskanych wyników badań. Takie rozwiązanie uważam za wartościowe, bowiem pozwala odnieść uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej zależności, do aktualnego stanu wiedzy. Całościowy materiał przedstawiono na 219 stronach maszynopisu, z włączeniem załączonych oryginałów opublikowanych prac, jak i oświadczeń współautorów. Warto podkreślić, że rozprawa została zredagowana niezwykle poprawnie stylistycznie i edytorsko, a pojawiające się nieliczne błędy w najmniejszym stopniu nie wpływają na jej odbiór.

Zaprezentowany cel badań uważam za rozbudowany i ambitny, a zarazem dobrze sprecyzowany i właściwie zdefiniowany. Nadrzędnym celem prac było przeprowadzenie syntezy/immobilizacji jonów cynku i srebra do białek zawartych w mleku i/lub serwatce oraz poznanie mechanizmów tych procesów i zaawansowana ocena powstających metalokompleksów i nanokompozytów ze szczególnym uwzględnieniem zdefiniowania aktywności biologicznej nanokompozytów i ich testów farmakologicznych. Doktorantka, aby zrealizować nadrzędny cel badań, postawiła także pięć celów szczegółowych, które odpowiadają poszczególnym etapom badań.

1. Synteza/immobilizacja jonów cynku oraz srebra przez białka mleka i białka serwatkowe
2. Fizykochemiczna charakterystyka powstałych układów.
3. Opis mechanizmu immobilizacji jonów cynku i srebra oraz tworzenie nanocząstek srebra.
4. Określenie aktywności biologicznej nanokompozytów.
5. Badania aplikacyjne nanokompozytów.

Opis uzyskanych zależności eksperymentalnych zaprezentowano w Rozdziale 3 Problem badawczy i zestawiono go z opisem aktualnego stanu wiedzy oraz wyzwaniem jakie ciągle pozostają nierozwiązane podczas projektowania układów białkowych. Doktorantka wydzieliła w tej części 3 podrozdziały, które korespondują ze

szczegółowymi celami badawczymi i doskonale obrazują zawartość rozprawy oraz poszczególne etapy prac. Przedstawiony opis jest swego rodzaju streszczeniem najistotniejszych rezultatów zaprezentowanych w pracach P1-P8, które stanowią podstawę monotematycznego cyklu artykułów w przedłożonej do oceny dysertacji. Choć zaprezentowanie uzyskanych zależności w kontekście istniejących wyzwań jest ciekawym podejściem, to w moim odczuciu ta część rozprawy powinna być nieco bardziej rozbudowana i zawierać nieco więcej wyników badań. Jest to uzasadnione faktem, że czasopisma w jakich zostały opublikowane wyniki prac eksperymentalnych potwierdzają ich nowość naukową oraz duże znaczenie poznawcze, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt ich oceny przez niezależnych ekspertów. Godne odnotowania jest, że przedstawione w rozprawie zależności są ważne nie tylko z naukowego, ale także z aplikacyjnego punktu widzenia. Co więcej, na wyróżnienie zasługuje także fakt, że Doktorantka w pracy zastosowała niezwykle szeroki zakres technik analitycznych, co pozwoliło na wielowymiarową analizę otrzymanych układów. Opracowanie nowej grupy metalokompleksów i nanokompozytów, w oparciu o białka zawarte w mleku, opisanie ich właściwości oraz testy aplikacyjne i zdefiniowanie aktywności biologicznej wsparte opisem matematycznym procesu i jego modelowaniem w istotny sposób mogą ułatwić projektowanie tego typu rozwiązań do zastosowań medycznych i farmaceutycznych.

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanych przez Doktorantkę zaliczam:

1. Opracowanie efektywnej metody immobilizacji jonów cynku oraz srebra z β -laktoglobuliną oraz jonów cynku z poszczególnymi frakcjami kazeiny, jak i opisanie charakteru tego procesu.
2. Zaawansowaną analizę fizykochemiczną oraz dyspersyjno-morfologiczną powstających układów umożliwiającą określenie zmian w ich strukturze przed i po połączeniu z jonami metali.
3. Zdefiniowanie mechanizmu procesu immobilizacji jonów srebra oraz cynku w oparciu zarówno o metody obliczeniowe, jak i modelowanie.
4. Szczegółową ocenę wpływu zmiennych procesowych zarówno na mechanizm przyłączenia, jak i właściwości końcowe produktów.
5. Udokumentowanie, że wytworzone nanokompozyty odznaczają się znaczną aktywnością przeciwdrobnoustrojową wobec patogenów o znaczeniu klinicznym.
6. Wykazanie efektywności opracowanych nanokompozytów w gojeniu ran w oparciu o przeprowadzone badania *in vivo* na modelu zwierzęcym.
7. Wskazanie, że opracowane układy metal-białko mogą przyczynić się do rozwiązania problemu lekooporności.

Oceniając całkowity dorobek Doktorantki należy podkreślić, że jest on na bardzo wysokim poziomie, zwłaszcza uwzględniając wczesny etap kariery naukowej. Pani mgr Agnieszka Rodzik jest współautorką w sumie czterestu artykułów naukowych (uwzględniając w tym artykuły wchodzące w monotematyczny cykl prac) oraz pięciu rozdziałów w monografiach. Doktorantka brała też czynny udział w licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych gdzie przedstawiła zarówno wystąpienia ustne, jak i prezentacje posterowe. Na szczególne podkreślenie zasługuje też udział w pięciu projektach naukowych, spośród których w czterech pełniła ona rolę kierownika projektu. Warto tutaj odnotować przede wszystkim grant PRELUDIUM 19 pt. „Wykorzystanie techniki laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganą matrycą oraz nanostrukturami w analizie hydrolizatów białkowych ze

szczególnym uwzględnieniem modyfikacji potranslacyjnych" finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Doktorantka jest także laureatką czterech nagród i/lub stypendiów, jak i rozwijała swoją wiedzę i zainteresowania poprzez udział w towarzystwach naukowych oraz szkoleniach.

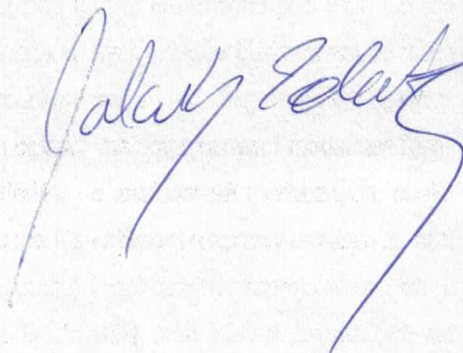
Obowiązkiem recenzenta jest jednak także wskazanie kwestii dyskusyjnych i/lub problematycznych w recenzowanej pracy. Choć wyniki zrealizowanych prac były już oceniane przez niezależnych ekspertów i nie jest moją rolą ich ponowna weryfikacja, to jednak pozwolę sobie wskazać kilka kwestii z prośbą do Doktorantki o szerszą dyskusję na ich temat. Chciałbym jednak podkreślić, że uwagi te stawiam głównie celem dyskusji i nie umniejszają one jednoznacznie pozytywnego odbioru pracy.

1. Proszę o rozwinięcie kwestii wykorzystania μ MER w analizie proteomicznej, zwłaszcza w zakresie trawienia białek. Dlaczego autotrawienie białek w takim układzie jest ograniczone? Prosiłbym też o rozwinięcie stwierdzenia „dostarcza bardziej wydajnego środowiska do trawienia białek” (str. 21). Z czego to środowisko może wynikać i jak termin ten jest przez Doktorantkę rozumiany?
2. Autorka w pracy P5 wspomina o zaletach μ MER w kontekście możliwości jego wielokrotnego wykorzystania trawienia białek. W pracy tej jednak brak wyników potwierdzających takie stwierdzenie, stąd moje pytanie, czy takie analizy były wykonywane.
3. Prosiłbym także o komentarz nt. toksyczności jonów srebra i nanocząstek srebra. W dysertacji doktorantka wskazuje na mocno ograniczoną toksyczność tych związków. Istnieją jednak doniesienia mówiące o ich negatywnym wpływie na organizmy żywe, stąd prośba o rozwinięcie tego zagadnienia.
4. Autorka w pracy zastosowała szerokie spektrum technik analitycznych do oceny właściwości powstałych układów i analizy mechanizmów ich tworzenia. Czy istnieją jeszcze inne techniki analityczne, jak np. mikroskopia sił atomowych, czy mikroskopia konfokalna, które można zastosować do jeszcze szerszej analizy wytworzonych układów? Jak można zbadać dystrybucję jonów metali wewnątrz struktury białka, a nie tylko na jej powierzchni?
5. W pracy, a także załączonych publikacjach Doktorantka zawarła znaczną ilość wartościowych zależności. Brakuje jednak zestawienia tabelarycznego najważniejszych uzyskanych danych i ich skonfrontowania z dostępnymi danymi literaturowymi. Stąd prośba do Doktorantki o uzupełnienie tych informacji.

Oceniając realizację założonego celu pracy, opublikowane artykuły naukowe oraz przedstawioną aktywność naukową, należy ocenić je jednoznacznie jako bardzo dobre. Co więcej, sposób zaplanowania eksperymentów, zrealizowanie oryginalnych i nowatorskich badań, interpretacja uzyskanych zależności oraz forma ich prezentacji wsparta wnikliwą i rzeczową analizą oraz dyskusją, świadczą nie tylko o wysokich kompetencjach naukowo-badawczych mgr Agnieszki Rodzik, ale także wskazują na znaczną dojrzałość Doktorantki.

Na podstawie oceny rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Agnieszki Rodzik zatytułowanej „Badanie mechanizmów tworzenia nanokompozytów metal-białko jako potencjalnych środków przeciwdrobnoustrojowych” oraz zawartej w dysertacji aktywności naukowej jednoznacznie stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wszystkie wymogi ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie pracy i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy doktorskiej, aktualność podjętej tematyki badawczej, zakres pracy eksperymentalnej, jakość uzyskanych danych i przedstawionych wniosków oraz ich wkład w istniejący stan wiedzy, wnioskuję ponadto do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Agnieszki Rudzik. Uzasadniając ten wniosek, chciałbym zwrócić szczególną uwagę na ambitne podejście Doktorantki do opracowania metod syntezy i charakterystyki nowej grupy zaawansowanych układów białko-metal, co może okazać się skuteczną metodą prowadzącą do podniesienia efektywności procesów realizowanych z ich zastosowaniem. Dodatkowo, testy użytkowe uzyskanych materiałów, wsparte opisem matematycznym i modelowaniem procesu w istotny sposób mogą ułatwić projektowanie tego typu układów do zastosowań medycznych, obejmujących m.in. leczenie ran, co ma niezwykle istotne znaczenie praktyczne. Ten element rozprawy uważam za szczególnie nowatorski i użyteczny, wskazujący ponadto na istotny potencjał aplikacyjny zaprojektowanych układów. Wymiernym potwierdzeniem interdyscyplinarnego podejścia Doktorantki oraz jakości uzyskanych zależności eksperymentalnych są także czasopisma, w których opublikowano prace będące podstawą do przygotowania dysertacji.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jacek Edul', is written over the bottom right portion of the page. The signature is fluid and cursive.