

Gdańsk, 26.02.2024 r.

Prof. dr hab. Magdalena Prokopowicz

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Kingi Mylkie pt.:

„Nanocząstki magnetyczne funkcjonalizowane polisacharydami zawierającymi ugrupowania kwasu boronowego do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny”

Recenzja pracy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę doktorską oceniłam pod kątem spełnienia wymagań wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Kingi Mylkie została zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w Katedrze Chemii Biomedycznej i Polimerów. Promotorem rozprawy jest Pani dr hab. Marta Ziegler-Borowska.

Praca doktorska ma formę tradycyjną - monografii naukowej. Jest napisana w sposób logiczny i konsekwentny. Rozpoczyna się od wykazu stosowanych skrótów i akronimów, następnie jest część teoretyczna, cel pracy i część eksperymentalna. Kolejnym elementem pracy są wyniki i dyskusja oraz przedstawienie podsumowania z wnioskami. Ostatnią częścią jest streszczenie w języku polskim, jak i wymagane ustawowo, w języku angielskim oraz spis literaturowy.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Nanocząstki magnetyczne są zbudowane najczęściej z tlenku żelaza o właściwościach superparamagnetycznych i znalazły zastosowanie w naukach biomedycznych, biotechnologicznych, w katalizie syntez chemicznych oraz ochronie środowiska. Obecnie, badania naukowe w tym obszarze skupiają się głównie na zapewnieniu nanocząsteczkom magnetycznym biokompatybilności, funkcjonalności chemicznej oraz stabilności, charakteryzującej się tendencją do ich agregacji. Jednym ze sposobów poprawy ich właściwości jest modyfikacja chemiczna powierzchni tlenku żelaza w celu uzyskania struktury typu rdzeń-powłoka. W strukturze takiej rdzeń z tlenku żelaza zachowuje swoje właściwości superparamagnetyczne, zaś powłoka może pełnić odpowiednie funkcje, w zależności od jej rodzaju. Pani mgr Kinga Mylkie postawiła sobie za cel naukowy poszukiwanie takich powłok

polimerowych, które służyłyby do selektywnej, wydajnej izolacji i oczyszczaniu białek z docelowych matryc biologicznych przy równoczesnym zapewnieniem stabilności nanocząstek magnetycznych. Po przeprowadzonym studium literaturowym w tym zakresie, stwierdziła brak doniesień naukowych dotyczących nośników magnetycznych zdolnych do wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny. W związku z tym, głównym Jej celem naukowym było zaprojektowanie i otrzymywanie nowych nanocząstek magnetycznych z powłokami polisacharydowymi zawierającymi ugrupowania kwasu boronowego o potencjalnym wykorzystaniu w naukach biomedycznych. Powłoki polisacharydowe mają pełnić dwie funkcje – wydajnie wiązać α -1-kwaśną glikoproteinę oraz ochrony przed agregacją nanocząstek magnetytu.

Cześć teoretyczna (43 stronicowa) wprowadza czytelnika w tematykę badawczą Doktorantki i przedstawia charakterystykę wybranych białek, metody syntezy nanocząstek magnetycznych, modyfikację ich powierzchni za pomocą chitozanu i skrobi. Doktorantka opisuje szczegółowo wykorzystanie magnetycznych nanocząstek modyfikowanych kwasami boronowymi do wiązania glikoprotein wraz z opisem metod ich syntezy, posilując się schematami, które w sposób jasny obrazują ich otrzymywanie. Należy stwierdzić, że przygotowanie teoretyczne Doktorantki na temat nanocząstek magnetycznych jest szczegółowe i wszechstronne, a część teoretyczna pracy doktorskiej jest syntetycznym kompendium wiedzy na ich temat.

Założony cel pracy Doktorantka zrealizowała poprzez prawidłowo zaplanowane i wykonane badania. Zakres tych zadań badawczych realizowanych przez Doktorantkę był szeroki i obejmował trzy kluczowe aspekty: syntezę nanocząstek magnetytu z modyfikowanymi powłokami polimerowymi, charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych oraz ocenę efektywności wiązania α -1-kwaśnej glikoproteiny. W pierwszym etapie zaprojektowała struktury nanocząstek magnetycznych modyfikowanych powierzchniowo za pomocą polisacharydów, takich jak chitozan i skrobia i ich chemiczną modyfikację w kierunku materiałów zawierających ugrupowania kwasów boronowych z wolnymi grupami dihydroksyborylowymi. Wybór takiego postępowania został przez Doktorantkę bardzo dobrze uzasadniony. Na podstawie przeglądu literaturowego oraz opierając się na swoich wstępnych badaniach, Doktorantka założyła, że obecność reaktywnych łańcuchów cukrowych w glikoproteinach może skutkować tworzeniem się kowalencyjnych wiązań z kwasami boronowymi. Miałyby to zachodzić szybko i wydajnie. Wykorzystując polimery, takie jak (i) chitozan niemodyfikowany; (ii) chitozan z różną ilością pierwszorzędowych grup aminowych odsuniętych od łańcucha głównego polimeru; (iii) chitozan

dialdehydowy; (iv) karboksymetylochitozan; (v) skrobię dialdehydową; (vi) karboksymetyloskrobię i ich poszczególną modyfikację kwasami boronowymi, tj. kwasem 3-aminofenyloboronowym i kwasem 4-formylofenyloboronowym, otrzymała z powodzeniem 9 materiałów, w tym 7 nowych nieopisanych do tej pory w literaturze, o różnej zawartości wolnych grup dihydroksyborylowych i różnym stopniu odsunięcia tych grup od łańcucha głównego. Tożsamość, strukturę i czystość otrzymanych materiałów potwierdziła za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego i spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w zakresie podczerwieni. Następnie, wykorzystując metodę współwytrącania *in situ* w środowisku zasadowym magnetytu, otrzymała z powodzeniem 9 nowych typów nanocząstek magnetycznych z odpowiednimi powłokami z ww. materiałów. *Nasunęło mi się pytanie do Doktorantki, czy na etapie ich syntezy wprowadzono jakiś czynnik sieciujący, jeżeli tak to jaki? i jaką metodą suszono otrzymane nanocząstki magnetyczne?, ponieważ nie znalazłam takich informacji w pracy.*

Następnie, konsekwentnie Doktorantka zbadala wybrane właściwości fizykochemiczne otrzymanych nanocząstek magnetycznych z powłokami polimerowymi z wykorzystaniem nowoczesnych i rekomendowanych technik analitycznych do badań ciała stałego:

- struktura chemiczna nanocząstek została potwierdzona przy użyciu spektroskopii całkowitego osłabionego odbicia w zakresie podczerwieni (ATR-FTIR),
- czystość rdzenia nanocząsteczek została zbadana za pomocą analizy dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD),
- analizę polidispersyjności wykonano z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i obrazowania transmisyjnym mikroskopem elektronowym (TEM),
- morfologia nanocząstek została zbadana za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM),
- stabilność termiczną nanocząstek magnetycznych oraz polimerów powlekających ich powierzchnię zbadano z wykorzystaniem analizy termicznej (TGA-DTA),
- porowatość nanocząstek zbadano wykorzystując badania izotermy adsorpcji-desorpcji azotu,

Na podkreślenie zasługuje również zbadanie nanocząstek magnetycznych w kierunku toksyczności ostrej wobec komórek bakterii *Allivibrio fischeri* wykorzystując test Microtox.

Reasumując, wybór i wykorzystanie w praktyce opisanych wyżej technik analitycznych świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki w obszarze związanym z analityką chemiczną i bioanalityką.

Do tej części eksperymentalnej mam trzy pytania: Jaki był czas i w jaki sposób przechowywano próbki badanych nanocząstek magnetycznych do odpowiednich analiz, np. do analiz termicznych? Jak zostały przygotowane próbki nanocząstek magnetycznych do analizy polidispersyjności metodą dynamicznego rozpraszania światła oraz do badań transmisyjnym mikroskopem elektronowym?

Ostatnim etapem badań Doktorantki było określenie potencjalnego wykorzystania nanocząstek magnetycznych do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny. Wykorzystując emisyjną spektroskopię fluorescencyjną Doktoranta zbadala wpływ pH środowiska (7,5 vs. 9,0) na efektywność tego procesu.

Wyniki i dyskusja (ok. 100 stronicowa) stanowią ocenę złożonych właściwości fizykochemicznych nanocząstek magnetytu z modyfikowanymi powłokami polimerowymi. Doktorantka potwierdziła struktury chemiczne wszystkich nanocząsteczek magnetycznych za pomocą ATR-FTIR. Wyniki z XRD potwierdziły, że rdzeń nanocząstek jest czystym magnetytem. Wyniki TEM i dynamicznego rozpraszania światła potwierdziły ochronną funkcję wszystkich powłok polimerowych. W większości średnie rozmiary sferycznych cząstek nie przekraczały 25 nm. *Zauważyłam pewne nieścisłości z obrazowaniem za pomocą TEM a podaną wartością średnią rozmiaru cząstek (str. 142). Bardzo proszę o komentarz Doktorantki w jaki sposób za pomocą TEM wyznaczyła średni rozmiar cząstek? Proszę również o przedstawienie jakie mogą występować ograniczenia czy też trudności przy stosowaniu metody DLS i TEM do analizy wielkości cząstek?*

Doktorantka potwierdziła swoimi wynikami, że wszystkie badane nanocząstki magnetyczne są zdolne do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny. Największą zdolność do wiązania glikoproteiny poprzez grupy dihydroksyborylowe stwierdzono dla nanocząsteczek magnetycznych pokrytych karboksymetyloskrobią modyfikowaną kwasem 3-aminofenyloboronowym, w pH 9,0. Ilość ta wynosiła 21,30 mg/g. *Chciałabym dopytać się Doktorantki jaka była wydajność tego procesu?*

Podsumowując tę część pracy, bardzo wysoko oceniam dyskusję wyników z analizy termicznej nanocząstek magnetycznych oraz polimerów pokrywających ich powierzchnię. Rzetelnie przeprowadzona dyskusja podparta wiedzą literaturową świadczy o tym, że Doktorantka bardzo dobrze porusza się w tym obszarze nauki. Za bardzo istotne uważam również przeprowadzenie przez Doktorantkę ocenę zdolności wiązania glukozy przez badane nanocząsteczki i porównawcze przedyskutowanie otrzymanych wyników z wynikami wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny. W mojej opinii, najważniejszym osiągnięciem Doktorantki było to, że na podstawie wyników własnych udowodniła tezę, że reszty kwasów boronowych na powierzchni nanocząstek mogą tworzyć wiązania z grupami

dukrowymi glikoprotein. Z pewnością uzyskane przez Doktorantkę wyniki i ich wyczerpujące omówienie dają podstawę do kontynuacji badań nad wykorzystaniem nanocząstek magnetycznych do wiązania glikoprotein.

W podsumowaniu pracy, Doktorantka wysnuła logiczne **wnioski** zawierające najważniejsze elementy i osiągnięcia wykonanych badań naukowych. Przede wszystkim ustaliła, że rodzaj powłoki polimerowej wpływa na wielkość nanocząstek magnetycznych, ich morfologię, termiczną stabilność oraz wydajność wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny. Doktorantka podkreśliła, że otrzymane przez nią wyniki mają charakter podstawowy i stanowią podwaliny do wykorzystania otrzymanych materiałów w testach diagnostycznych, jak i również w wyznaczaniu parametrów farmakokinetycznych substancji czynnych, czy też do dezaktywacji np. wirusów na drodze selektywnego wiązania glikoprotein. *Chciałabym zapytać się Doktorantki, w jaki sposób można ten cel praktycznego ich zastosowania zrealizować wykorzystując próbki biologiczne? Na co należy zwrócić uwagę i na jakie trudności można się napotkać w czasie jego realizacji?*

Pragnę dodać, że przedstawione powyżej pytania do Doktorantki nie umniejszają w żaden sposób wartości pracy i wynikają z czystej ciekawości naukowej.

Pracę doktorską Pani mgr Kingi Myłkie oceniam bardzo wysoko. Ze względów formalnych spełnia wszelkie wymogi stawiane pracy doktorskiej. Jest napisana starannie i zawiera tylko nieliczne błędy edytorskie. Praca doktorska liczy 228 stron i jest oparta o 199 pozycji literaturowych. Jest bogato udokumentowana, zawiera rysunki i tabele. Z przesłanego przez Doktorantkę dorobku naukowego wynika, że wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane w jednej publikacji, w której Doktorantka jest pierwszym autorem o współczynniku oddziaływania IF wynoszącym 3,623 i liczbą punktów MEiN równą 140. Należy podkreślić, że całkowity dorobek naukowy Pani mgr Kingi Myłkie jest bardzo duży. Łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 57.271, liczba punktów MEiN to 1480, liczba cytowań 146 i indeks Hirscha 6. Świadczy to o umiejętności Doktorantki do pracy i realizacji zadań badawczych w zespołach naukowych. Podsumowując, przedstawiona do oceny praca wnosi nowe elementy do stanu wiedzy na temat fizykochemii i potencjalnego wykorzystania nanocząstek magnetycznych do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny w zastosowanych przez Doktorantkę warunkach doświadczalnych. Główną

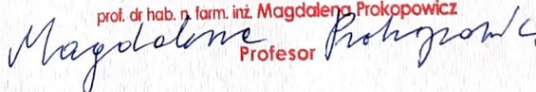
nowością była synteza nowych powłok polimerowych dla nanocząstek magentytu oraz przedstawienie charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych nanocząstek.

Wniosek końcowy

Oceniana praca doktorska autorstwa Pani mgr Kingi Myłkie spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z 14 marca 2002 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2 i 3 Ustawy z 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie pracy Pani mgr Kingi Myłkie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdańsk

prof. dr hab. n. farm. inż. Magdalena Prokopowicz


Profesor