



OCENA

pracy doktorskiej Pani mgr Ewy Czechowskiej, zatytułowanej: „*Badanie procesu przyłączania katalazy i dysmutazy ponadtlenu do powierzchni nanocząstek metalicznych*”. Ocena wykonana została na zlecenie Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, Pani Profesor Sławomiry Skrzypek.

Przedstawiona mi do recenzji praca wykonana została w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jarosława Grobelnego. Z przedstawionych informacji wynika, że Doktorantka uczestniczyła w charakterze wykonawcy w realizacji czterech projektów badawczych:

1. „Analiza potencjału antyoksydacyjnego białek immobilizowanych na nanocząstkach. Badania in vivo, in vitro.” Finansowanego z NCNauki; kod projektu 2013/09/B/NZ7/01019 Kierownik projektu: prof. dr hab. Janusz Szemraj, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
2. „Generowanie nanocząstek srebra na grafenie” – projekt naukowo-badawczy finansowany z dotacji w ramach konkursu dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2015 roku; kod projektu B1511100000879.02. Kierownik projektu: dr Emilia Tomaszewska
3. „Funkcjonalizacja nanomateriałów do zastosowań biologicznych” – projekt naukowo-badawczy finansowany z dotacji w ramach konkursu dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2017 roku; kod projektu B1711100001603.02. Kierownik projektu: dr Katarzyna Ranoszek-Soliwoda
4. „Kontrolowana funkcjonalizacja nanomateriałów” – projekt naukowo-badawczy finansowany z dotacji w ramach konkursu dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2018 roku; kod projektu B1811100001860.02 Kierownik projektu: dr Katarzyna Ranoszek-Soliwoda.

Praca obejmuje 156 stron, włączając w to 93 rysunki, 24 tabele, 144 pozycje literatury oraz wykaz dorobku naukowego. Praca zawiera: Spis skrótów, Streszczenie, Część literaturową, Część doświadczalną, a w niej cel, tezę i zakres pracy, bez wyszczególnienia metod i wyników badań, Spis rysunków, Spis tabel, Dorobek naukowy i Bibliografię.

Bio- i nano-technologie, oprócz technologii informatycznych, należą do najbardziej intensywnie rozwijających się obszarów badawczych i technologicznych, a szczególnie interesujące osiągnięcia pojawiają się na pograniczu tych obszarów. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w stosunkowo nowej strategii badawczej określonej mianem MATERIOMIKI. W tym sensie podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza dobrze wpisuje się w najbardziej aktualne trendy badawcze i technologiczne.

Manuskrypt rozpoczyna się streszczeniem dobrze ujmującym treść całej rozprawy. Następnie autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy w zakresie niespecyficznej i specyficznej adsorpcji białek na powierzchni nanocząstek, nie wiadomo jednak dlaczego skrupulatnie omijając powszechnie stosowany do opisu tego zjawiska termin efektu korony białkowej (protein corona effect), o którego

obecności w literaturze Doktorantka była świadoma przywołując prace poświęcone temu zjawisku (75, 76, 87, 118, 123, 133). Przedstawione i omówione zostały różne metody, zarówno chemiczne, jak i fizyczne immobilizacji białek, na ogół poprawnie i czytelnie. Bardzo zasadnie zwrócona została uwaga na wpływ rozmiaru nanocząstki, a szczególnie krzywizny powierzchni, na efektywność immobilizacji białek. Zabrakło jednak w tym miejscu bliższej analizy wpływu rozmiaru samych cząsteczek białkowych na dyskutowany proces. Warto zwrócić uwagę na to, że cząsteczki białkowe są także nanostrukturami, a proces ich oddziaływania z nanocząstkami złota i srebra należałoby przedyskutować właśnie w aspekcie rozmiarów i geometrii zarówno metalicznych nanocząstek, jak i białek. Dla przykładu, cząsteczka fibrynogenu ma rozmiary: $9 \times 47,5 \times 6$ nm przy masie cząsteczkowej 340 k, a nie jest to wcale największe białko. W takim przypadku należałoby rozważyć, czy to białko wiąże się do powierzchni nanocząstki, czy też odwrotnie nanocząstka wiąże się do cząsteczki białka. Pomocna przy tego typu rozważaniach mogłaby być praca Harolda P. Erickson'a zatytułowana: „Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy” w Biological Procedures Online, Volume 11, Number 1, 2009, ed. Shulin Li. W następnej części Doktorantka krótko omówiła rolę i strukturę dwóch enzymów, Dyzmutazy ponadtlenkowej (SOD) i Katalazy (CAT), uczestniczących w ochronie organizmu przed nadmiernym działaniem reaktywnych form tlenu. Przedstawiła także doniesienia literaturowe dotyczące immobilizacji tych enzymów do różnych nośników, a także efektywności metod immobilizacji i aktywności unieruchomionych enzymów.

W kolejnej części wstępu teoretycznego omówione zostały metody analityczne przydatne do realizacji celów założonych w pracy doktorskiej. Metodami tymi są: Elektroforeza w żelach poliakrylamidowych, włączając elektroforezę 2D, metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS), spektroskopia UV-VIS, spektroskopia dichroizmu kołowego, spektroskopia w podczerwieni z analizą FTIR, kalorymetria ITC, mikroskopia TEM i niskokątowe rozpraszanie promieni X ASXS. Wszystkie te metody zilustrowane zostały dobrze dobranymi przykładami zastosowań raportowanymi w literaturze.

W kolejnym rozdziale (rozdział 5) przedstawiony został cel, teza i zakres pracy. Jako cel pracy przyjęto: *„...wytworzenie funkcjonalnych koniugatów nanocząstka-białko, poprzez przyłączenie białek enzymatycznych, katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej, do powierzchni nanocząstek złota i srebra z zachowaniem ich aktywności enzymatycznych oraz opracowanie metody ilościowej analizy białka przyłączonego do powierzchni nanocząstek opartej na technice elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.”* Przedstawiony cel pracy ma charakter złożony i właściwie składa się z dwóch celów. Zdaniem recenzenta nie zawsze więcej znaczy lepiej. Wydaje się, że wytworzenie funkcjonalnych koniugatów nanocząstka-białko, ze wskazaniem zarówno nanocząstek złota i srebra, jak i wybranych enzymów, byłoby wystarczająco wymagającym celem pracy, natomiast opracowanie metody ilościowej analizy białek przyłączonych do nanocząstki należałoby potraktować jako cel dodatkowy lub krok pośredni służący do osiągnięcia celu głównego pracy. Takie przedstawienie celu z całą pewnością nie umniejszyłoby wagi przedstawionej pracy, a nadałoby pracy większej czytelności, tym bardziej, że w dalszym tekście rozprawy metoda elektroforetycznej analizy ilościowej immobilizowanego białka jest w taki właśnie sposób prezentowana. Jest metodą prowadzącą do osiągnięcia założonego celu wytworzenia koniugatów nanocząstka-białko, metodą pozwalającą na optymalizację warunków immobilizacji białka.

Praca nie straciłaby też na wartości gdyby usunięto z niej tezę, a właściwie znów dwie odrębne tezy. Dla recenzenta tezy te wydają się być trywialne gdyż można sprawdzić ich prawdziwość na podstawie dostępnej literatury, nie odwołując się do wyników zaprezentowanych w pracy. Proces przyłączenia dowolnego białka do powierzchni metalicznej nanocząstki wymaga wyboru odpowiedniej dla danej pary nanocząstka-białko metody, która dodatkowo umożliwi realizację właściwego celu samej

immobilizacji. Doktorantka ładnie pokazała to we wstępnej części pracy. Natomiast wykorzystanie elektroforezy w celach analitycznych nie jest rzadkością, także w odniesieniu do analizy oddziaływań białek z nanocząstkami. Przykłady można znaleźć w szeregu prac i Doktorantka wiele z nich omówiła w części teoretycznej. Na uwagę zasługuje praca przeglądowa opublikowana w *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2019) 411:79–96, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1401-3>. Oczywiście, na potrzeby własne Doktorantka musiała dostosować warunki elektroforezy i zrobiła to z dobrym skutkiem.

W rozdziale tym przedstawiono także w sześciu punktach zakres pracy, który jest całkiem obiecujący, ale zupełnie pomija techniki elektroforetyczne bardzo istotne dla pracy.

W kolejnym rozdziale (szóstym) zaprezentowana jest aparatura badawcza wykorzystana podczas realizacji pracy, a także wykorzystane odczynniki. Lista aparatury jest jednak niekompletna, dla przykładu brakuje informacji o aparaturze użytej w testach aktywności enzymatycznej. Podobnie, lista odczynników nie jest kompletna i brakuje na niej choćby kwasu tetrachlorozłotowego (HAuCl_4) i cytrynianu sodowego.

Opisane są także metody: DLS, spektrofotometria UV-VIS, SEM, elektroforeza PAGE i 2D, a także badanie aktywności enzymatycznej. Niestety ostatnia z metod opisana jest niezwykle ubogo, podane są tylko nazwy zestawów i producent, brakuje całkowicie informacji o warunkach przeprowadzenia testów. W rozdziale tym podana jest także krótka informacja o metodach syntezy nanocząstek złota i srebra

W rozdziale siódmym przedstawiono charakterystykę zastosowanych w pracy koloidów nanocząstek złota i srebra.

Rozdział ósmy dotyczy opracowania metody elektroforetycznego ilościowego oznaczania białka zaadsorbowanego do powierzchni nanocząstek. Przedstawione zostały standardowe metody i warunki elektroforezy w żelu poliakrylamidowym i warunki rozdziały w systemie elektroforezy DISC (10% żel, 200V, 40 min). Następnie wykonane zostały rozdziały elektroforetyczne próbek nanocząstek złota opłaszczonych monomerem katalazy o masie cząsteczkowej 60k. Przeprowadzono analizę dla czterech różnych warunków elektroforezy: (a) redukującej SDS-PAGE, (b) nieredukującej SDS-PAGE, (c) β -merkaptotoetanol-PAGE oraz (d) natywnej. Wyniki rozdziałów przedstawione są na rys. 43. Zaprezentowane obrazy żeli i podpis pod rysunkiem niestety nie dostarczają czytelnikowi wielu informacji niezbędnych do ich analizy. Przede wszystkim dla SDS-PAGE nie przedstawiono markerów mas cząsteczkowych, przez co trzeba raczej zgadywać jakie są masy cząsteczkowe widocznych prążków. Nie zaznaczono także granicy pomiędzy żelami stacking i running, przez co nie można ocenić, czy widoczne na wysokości około $\frac{3}{4}$ długości żelu rozmazane prążki obecne na prawie wszystkich ścieżkach, to właśnie ta granica pomiędzy żelami, czy może analizowane białka. Na pewno wyraźnie widoczne prążki na dole żelów SDS-PAGE (a i b, ścieżka 5) odpowiadają białkom o masach 15-20k, przez co nie mogą być traktowane jako podjednostki katalazy o masie 60k.

Kolejne dwa rozdziały dotyczą wykorzystania metody elektroforetycznej do oceny ilości białka przyłączonego do nanocząstek złota i srebra. Na rysunku 50 przedstawiony jest żel bez opisu warunków elektroforezy. Jeżeli jest to rozdział SDS-PAGE to masa cząsteczkowa widocznego prążka nie odpowiada masie katalazy, a jeżeli jest to rozdział natywny, to dlaczego inny jest wzór prążków niż na rys. 43 i 48? Z kolei na rysunku 55 położenie prążków jest jeszcze inne niż na rysunku 50. Czy warunki elektroforezy były takie same? Podobne wątpliwości dotyczą rysunków 60, 65, 68 i 72. Podobnie nie jest jasne dlaczego w elektroforezie natywnej oraz w elektroforezie w warunkach zredukowanych obraz jest identyczny i tak skomplikowany (rys. 43 i 48). Poproszę Doktorantkę o przedstawienie nieco szerszego wyjaśnienia tego problemu. Podobnych zastrzeżeń nie mam w stosunku do wyników uzyskanych dla dyzmutazy choć i tutaj na uwagę i dodatkowe wyjaśnienie

zasługuje ocena wartości punktu izoelektrycznego duzmutazy wykonana w warunkach elektroforezy 2D. Przedstawiony w pracy wynik w granicach 8,58 – 9,37 średnio koresponduje z wartościami podawanymi w bazie SwissProt 2D-PAGE, który zawiera się w przedziale 6,76 – 7,78. Skąd taka rozbieżność? Pozostałe metody analityczne (SEM i spektrometria UV-VIS) dostarczyły wiarygodnych wyników potwierdzających przyłączanie białek do powierzchni nanocząstek.

Rozdział jedenasty poświęcony jest badaniu aktywności biologicznej podjednostek CAT i SOD po ich immobilizacji. Brak informacji dotyczących warunków eksperymentalnych nie pozwala niestety na pełną analizę zaprezentowanych wyników. Nie jest jasne w jaki sposób dobrano wyjściową aktywność wolnego enzymu i dlaczego wraz ze wzrostem rozmiaru nanocząstek, a tym samym ze wzrostem liczby kopii enzymu maleje oznaczona aktywność. Dlaczego początkowa aktywność swobodnego enzymu także maleje w kolejnych eksperymentach wraz ze wzrostem rozmiaru nanocząstki złota (rys. 90)?.

Kolejny, dwunasty rozdział, znalazł się w pracy chyba przez przypadek. Oczywiście rozumiem, że w zamyśle Doktorantki miało to być potwierdzenie aktywności immobilizowanych enzymów w warunkach *in vivo*, ale nie do końca zamysł ten powiódł się. Opis eksperymentu jest mocno niepełny i jak sama Doktorantka stwierdza: „Szczegółowa analiza uzyskanych wyników wykracza jednak poza zakres przedstawionej pracy doktorskiej. Została ona szerzej opisana w pracy [144].” Tyle, że praca [144] ma status przyjętej do publikacji i nie miałem szansy na zapoznanie się z jej treścią.

Czytając i analizując przedstawioną mi prace odniosłem wrażenie znacznego zamętu edycyjnego. Jak rozumieć myśl (str. 16) : „.....wykazują nanostrukturyzację w swoich powłokach ligandów z powodu rozdziału faz, wynikającego z krzywizny powierzchni.”? Warto pamiętać, że nie ma pełnej zwrotnej relacji pomiędzy białkiem i enzymem, że podjednostka enzymu to nie to samo co cała cząsteczka enzymu, warto też w sposób jednoznaczny wyrażać myśli i oceny. Zdaniem recenzenta warto też oddzielić prezentację wyników od ich interpretacji. Znacznie ułatwia to analizę treści, a także umożliwia przeprowadzenie łatwo czytelnej dyskusji i wnioskowania.

Żeby jednak nie pozostawić wrażenia, że moje nastawienie jest bardzo krytyczne chciałbym podkreślić potencjalną użyteczność wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy, a także zwrócić uwagę na przemawiające do wyobraźni graficzne schematy pokazujące sposoby immobilizacji białek, ich późniejszej dostępności biologicznej, także w relacji z rozmiarem nanocząstki i krzywizną jej powierzchni.

Pomimo przedstawionych powyżej pytań i uwag krytycznych stwierdzam, że praca jest wartościowa i wnosi istotne wartości poznawcze, oraz dokumentuje dobre przygotowanie warsztatowe Doktorantki. Wobec powyższego oceniana praca spełnia wymagania stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami zamieszczonymi w Ustawie z dnia 21 kwietnia 2017 roku.

Przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Ewy Czechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dobra Nowiny, 28 lutego 2020

Bohdan Czechowski