

Prof. dr hab. Lucyna Alicja Woźniak  
Zakład Biologii Strukturalnej  
Katedra Biologii Medycznej

Łódź, 2-03-2020 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Ewy CZECHOWSKIEJ zatytułowanej „*Badanie procesu przyłączania katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej do powierzchni nanocząstek metalicznych*” przedstawionej Radzie Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Łódzkiego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych

Przedłożona mi do recenzji dysertacja pozostaje w nurcie badań syntezy i zastosowań nanocząstek srebra i złota jako nośników biomolekuł o potencjalnych właściwościach terapeutycznych, stanowiącym przedmiot zainteresowań zespołu kierowanego przez prof. dr. hab. Jarosława Grobelnego, Promotora recenzowanej dysrtacji, w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Rozprawa została przygotowana w podziale materiału na dwie części, obejmujące Część Literaturową (42 str.) i Część Doświadczalną (63 str.), Spis Literatury obejmujący 144 wybrane pozycje literaturowe, Spisy Rysunków i tabel, skrótów, oraz dorobek Autorki.

W dysertacji Doktorantka nie wyodrębniła części Dyskusja Wyników, która pokazałaby w szerszym kontekście, również na tle doniesień literaturowych, dorobek Autorki (prace własne i to nie wszystkie cytowane są w części doświadczalnej). Doktorantka ograniczyła się jedynie do podsumowania i wniosków w Części Doświadczalnej (4 str.).

Dorobek publikacyjny stanowi 5 prac oryginalnych opublikowanych w bardzo dobrych (Nanomedicine IF 4,717, Colloids & Surfaces B, IF 3,973) i dobrych (Appl Biochem Biotechnol IF 2,14) czasopismach naukowych, których Ewa Czechowska jest współautorką, z tego jedna praca, gdzie jest pierwszą autorką (Colloids & Surfaces B, 2018, IF 3,973) o łącznym IF 16.94. Przy znaczącym dorobku publikacyjnym Recenzentce nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka nie skorzystała z możliwości przedstawienia



opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów opatrzonego komentarzem i dyskusją wyników.

Przegląd literaturowy (128 ze 144 pozycji bibliografii) wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy, dając szeroki obraz zarówno syntezy i właściwości fizycznych nanocząstek złota i srebra, ich właściwości chemicznych fizycznych oraz biologicznych, w tym roli w funkcjonowaniu w układach biologicznych, funkcji jako enzymów na nośnikach, inhibitorów enzymów, oraz oddziaływań tychże związków z innymi biomolekulami.

Doktorantka w części literaturowej sporo uwagi poświęciła enzymom antyoksydacyjnym, w tym dysmutazom ponadtlenkowym (SOD-1, SOD-2 i SOD-3) oraz katalazie CAT, które stanowiły przedmiot jej badań (zastrzeżenia budzi dobór referencji, szczególnie pozycje 93 i 95 o charakterze raczej historycznym lub popularno-naukowym), oraz dotychczasowym wynikiem immobilizacji tych białek na powierzchni nanocząstek (publikacje 104-111).

Oddzielna i znacząca część przeglądu literatury poświęcona jest opisowi metod analizy białek, nanocząstek i ich koniugatów z białkami, w szczególności elektroforezie w żelach poliakrylamidowych.

Publikacje, w których Doktorantka jest współautorką są po prostu wymienione (np. str. 61) i Autorka praktycznie nie odnosi się szerzej do ich treści w całej dysertacji, co stanowi utrudnienie w zbudowaniu pełnego obrazu obszernej pracy doktorskiej i zależności pomiędzy wynikami opublikowanymi i nieopublikowanymi. Co więcej praca [1] w spisie dorobku: Catalase- Modified...Radoszek et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017) nie jest w ogóle cytowana w dysertacji, pomimo że dotyczy wykorzystania elektroforezy do wyznaczania stopnia adsorpcji CAT na AuNPs13, szeroko omawianej w pracy.

### **Badania własne**

Celem pracy było wytworzenie funkcjonalnych koniugatów nanocząstek-białko poprzez przyłączenie białek enzymatycznych: katalazy (CAT) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) do powierzchni nanocząstek złota i srebra wytworzonych w trakcie przygotowania pracy doktorskiej, jak również opracowanie metody ilościowej analizy białek przyłączonych do nanocząstek złota i srebra, opartej na wykorzystaniu elektroforezy w żelu poliakrylamidowym

#### Tak postawiony cel doktorantka zrealizowała całości.

Zgodnie z opisem, Autorka otrzymała i scharakteryzowała nanocząstki złota AuNP13-AuNP42 i srebra AgNP13-AgNP45 o różnych rozmiarach i polach powierzchni oraz stosunkowo wąskim rozrzucie wielkości nanocząstek (Tabela 4 oraz Rys. 41 i 42).

W opisie brak odnośników literaturowych. Czy Autorka korzystała z metody Wojtowicz-Krawiec et al. (pozycja [33] cytowana w [134]) czy jest to metoda (niecytowana Turkievicha- str.61. Może z pracy [1]. Czy różnice w wydajności immobilizacji pomiędzy

opisem w dysertacji odzwierciedlają różnice w warunkach reakcji opisanych w artykule Catalase-modified gold nanoparticles.....(Colloids and Surfaces B, 2017) i dysertacji?

Autorka nie komentuje różnic w rozrzucie rozmiarów koloidów nanocząstek srebra i złota, a także różnic gęstości powierzchniowej enzymów (pokryć powierzchni), chociaż w przypadku AuNP-CAT maksymalną, znacząco najwyższą gęstość Autorka uzyskała dla AuNP20.

Autorka otrzymała biokoniugaty katalazy CAT z nanocząstkami złota na drodze niespecyficjnej adsorpcji fizycznej oraz specyficjnej adsorpcji chemicznej z wykorzystaniem linkerów i zbadała ich właściwości (dla porównania Rys. 89, str. 118)

Pytania szczegółowe do tej części pracy:

1. Dlaczego Doktorantka używa terminu „specyficjna adsorpcja fizyczna” dla procesu (Rys. 58), w którym oddziaływania chemiczne pomiędzy znacznikiem polihistydynowym CAT a linkerem na powierzchni AuNP, zawierającym jon  $Ni^{2+}$  jest odpowiedzialne za tworzenie biokoniugatów.
2. Dlaczego w Tabeli 9 brakuje pokrycia powierzchni teoretycznego dla średnicy nanocząstki 1AuNP-13? Zgodnie z opisem (str. 82) tzw. teoretyczne pokrycie to pokrycie maksymalne w warunkach eksperymentu.
3. Pokrycie powierzchni wyznaczony metodą PAGE jest znacząco niższe niż tzw. pokrycie teoretyczne. W jaki sposób wyznaczono pokrycie teoretyczne i czy różni się ono w zależności od enzymu? Autorka nigdzie nie odwołuje się do danych literaturowych a jedynie pisze o tzw. obliczeniach teoretycznych. Na czym one polegały?
4. Czy pokrycie powierzchni (Tabela 12) odpowiada obsadzeniu teoretycznemu (Rys. 66)?
5. Dlaczego pokrycie powierzchni teoretyczne dla nanocząsteczek AuNP-LA-NTA-Ni oraz AuNP (Tabela 9 i 12 oraz Rys. 56 i 66) różni się tak znacząco? Jak wyliczono pokrycie teoretyczne dla AuNP-LA-NTA-Ni-CAT?
6. Jaką rolę odgrywa w tym przypadku typ łącznika? Jakimi kryteriami posługiwała się Doktorantka w doborze łącznika? Czy korzystała z danych literaturowych?
7. Jakie Doktorantka ma dowody na procesy adsorpcji-desorpcji CAT na AgNP?

Do ilościowego oznaczenia ilości białek immobilizowanych na powierzchni nanocząstek Doktorantka z powodzeniem wykorzystwała powszechnie stosowaną do analizy białek elektroforezę w żelach poliakrylamidowych oraz znane metody wybarwiania srebrem. Autorka poświęciła w pracy wiele uwagi opisowi eksperymentów elektroforetycznych (str. 69-76), z uwzględnieniem drobiazgowego doboru warunków elektroforezy a także ilościowej metody oznaczania białek i wykorzystaniu metody do analizy wszystkich biokoniugatów z nanocząstkami Au i Ag.

W rozważaniach na temat mechanizmu immobilizacji katalazy na powierzchni nanocząsteczek autorka stosuje znacząco uproszczone, mechaniczne podejście do struktury białka, nie uwzględniając zmian konformacji oraz centrum aktywnego. Jednocześnie w tych rozważaniach podaje argumenty które, wydają się truizmami np. str.84: „ze wzrostem średnicy nanocząstki rośnie również jej promień krzywizny, a w konsekwencji jej powierzchnia będzie coraz bardziej płaska”....

Doktorantka nigdzie w części doświadczalnej nie powołuje się na wcześniejsze prace innych autorów, w których wykorzystano reakcje bądź metody stosowane w prezentowanej dysertacji. Sprawia tym wrażenie, że reakcje opisane w pracy są przygotowane po raz pierwszy. Dotyczy to zarówno syntezy nanocząsteczek jak również immobilizacji katalazy i dysmutazy zarówno w przypadku specyficznej jak i niespecyficznej adsorpcji fizycznej.

Szerszego komentarza wymaga niespecyficzna adsorpcja fizyczna katalazy do powierzchni nanocząstek srebra. Autorka analizuje żele po wybarwieniu srebrem i identyfikuje w nich białko niezwiązane z nanocząstkami we wszystkich przeprowadzonych eksperymentach. Interpretuje ten wynik obecnością jonów srebra w koloidzie i kompleksowaniem ich do katalazy. Nie wyjaśnia, w jaki sposób takie kompleksowanie wpływa na wydajność syntezy biokoniugatów a także na równowagę pomiędzy z kompleksowanym z  $Ag^+$  i immobilizowanym białkiem (str.95).

Osobny rozdział części doświadczalnej poświęcony jest badaniu aktywności biologicznej enzymów CAT i SOD po unieruchomieniu na powierzchni nanocząsteczek. Badanie aktywności przedstawiono sposób bardzo skrótowy. Pokazano zmiany w czasie (Rys. 89-92) aktywności dotyczące tych enzymów bez podania warunków, co stanowi istotny element opisu. Podanie nazwy i producenta zestawu do badania aktywności nie nosi znamion opisu eksperymentu. Takie podejście stanowi znaczne utrudnienie w analizie przedstawionych wyników i ma raczej charakter poglądowy.

W pracy Autorka odwołuje się wielokrotnie do „obliczeń teoretycznych”, pod którymi, jak się wydaje często kryją się proste obliczenia pola powierzchni kuli o znanym promieniu lub przeliczenia stężeń/ ilości enzymów.

„Ilość białka użytego do modyfikacji obliczono teoretycznie jako....cząsteczek monomerów ...przypadających” (str. 77, 86, 94, 102, 108, 111)

„Ilość linkera została teoretycznie obliczona i wynosiła 1 cząsteczkę na 1 nm<sup>2</sup> AgNP” (str. 111)

Co oznacza stwierdzenie: Niespecyficzna adsorpcja fizyczna CAT na powierzchni nanocząstek może prowadzić do częściowego zablokowania aktywnego miejsca enzymu z powodu statystycznego rozmieszczenia cząsteczek katalazy na powierzchni AuNP (str. 118)?

Dlaczego aktywność katalazy wolnej [U/mg] na Rys. 89 a i b oraz Rys. 90 a,b i c różni się znacząco? Czy Autorka używała różnych katalaz? Można domniemywać, że CAT niezwiązana (wolna) powinna mieć taką samą aktywność we wszystkich próbkach analizowanych, jeśli warunki eksperymentu były takie same.

Wniosek na str. 122 „Uzyskane wyniki aktywności CAT i SOD po przyłączeniu do nanocząstek złota i srebra dowodzą, że zarówno metoda unieruchomienia białka jak i rodzaj nośnika wpływa na aktywność enzymatyczną białek” są nadmiernym uogólnieniem, gdyż z prezentowanych wcześniej danych zmian aktywności dysmutazy ponadtlenkowej SOD (rys. 92a-d i 93 a-d) wynika, że dysmutaza SOD po przyłączeniu do nanocząstek złota lub srebra ma aktywność równą aktywności enzymu niezwiązanego.

W omawianej dysertacji Autorka zastosowała bardzo ogólne ujęcie badań własnych, nie wyodrębniając części dyskusja i takiego fragmentu, porządkującego opisane wyniki w pracy brakuje, przez co pozostaje niedosyt, jeśli chodzi o wnioski na temat uzyskanych wyników i odniesienie ich do szerszego tła syntezy immobilizowanych enzymów i ich wykorzystania, w tym opublikowanych prac na ten temat, których Doktorantka jest współautorką.

Z obowiązku recenzenta muszę skomentować i wskazać drobne uchybienia i nieścisłości językowe, które najwyraźniej umknęły uwadze doktorantki w trakcie przygotowywania manuskryptu oraz jego korekty. Szczególnie ważne wydaje się zwrócenie uwagi na unikanie języka potocznego i precyzyjne określenie zjawisk i pojęć chemicznych, fizycznych i biologicznych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Czechowskiej stanowi interesujący wkład do wiedzy o nanocząstkach złota i srebra, ilustrowany przykładami immobilizacji na ich powierzchni wybranych dwóch białek CAT i SOD, z wykazaniem zmian aktywności tych białek po immobilizacji w warunkach modelowych badań *in vitro* i *in vivo*.

Warto podkreślić, że Doktorantka brała udział w realizacji dwóch projektów badawczych NCN, oraz że część badań własnych wykonała we współpracy z zespołami badawczymi z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Łodzi.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że oceniana przeze mnie rozprawa spełnia w pełni wymagania określone w tekście Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym w części dotyczącej trybu uzyskania stopnia doktora. Wnoszę więc do Wysokiej Rady wniosek o podjęcie pozytywnej decyzji w sprawie dopuszczenia mgr Ewy Czechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

