



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

Dr hab. inż. Hanna Staroszczyk, prof. PG  
Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska

Gdańsk, 11 kwietnia 2023 r.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Oleksandry Pryshchepa  
pt. „Badanie molekularnych mechanizmów wiązania metali z białkami”  
wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Pawła Pomastowskiego, prof. UMK  
w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Praca doktorska Pani mgr Oleksandry Pryshchepa dotyczy wciąż słabo poznanych mechanizmów molekularnych wiązania metali z białkami i przedstawia nowatorskie opracowanie syntezy kompleksów laktoferyny (LTF) z metalami przejściowymi, które mają istotne znaczenie dla rozwoju chemii i biologii, w szczególności w projektowaniu związków o znaczeniu praktycznym. Badania zostały sfinansowane ze środków: (a) Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, w ramach projektu pt. „Zaawansowane biokompozyty dla gospodarki jutra”; (b) Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza, ID-UB”; (c) Wydziału Chemii UMK w Toruniu w ramach trzech projektów realizowanych w 2019, 2020 i 2021 roku.

Rozprawa ma charakter zbioru 5 opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Wszystkie prace są wieloautorskie (od 3 do 13 współautorów), w czterech z nich Pani Oleksandra Pryshchepa jest pierwszym autorem, w jednej drugim, a w trzech autorem korespondencyjnym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie indeksowanych przez bazę Scopus, jednocześnie znajdują się one w wykazie wysoko punktowanych czasopism MEN z 2022 r. (sumaryczny IF = 33,28, pkt MEN = 750), m.in. *Advances in Colloid and Interface Science* (IF = 15,19, pkt MEN = 200) i *Journal of Dairy Science* (IF = 4,225, pkt MEN = 200). Rozprawa liczy 185 stron, składa się z 9 rozdziałów, wykazu dorobku naukowego oraz dołączonych oświadczeń współautorów.

## Wartość merytoryczna rozprawy

W pierwszym rozdziale pracy Doktorantka wyjaśnia, dlaczego rozpoczęła badania nad kompleksami metal-LTF, następnie zwięźle opisuje jakich zadań podjęła się realizując te badania i na koniec podaje możliwości wykorzystania takich związków. W drugim rozdziale Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z występowaniem, strukturą oraz wybranymi właściwościami fizykochemicznymi LTF, w tym zdolnością białka do wiązania metali i jego aktywnością biologiczną. W trzecim rozdziale początkowo skupia się na oddziaływaniach metal-białko, podkreślając znaczenie jonów metali będących ważnymi modulatorami procesów biologicznych i zwracając uwagę na charakter wiązania takich jonów do aktywnych grup funkcyjnych białek, ich specjacji, miejsc wiązania oraz konsekwencji molekularnych i strukturalnych takich oddziaływań, aby na tym tle szerzej omówić kompleksy LTF ze srebrem, żelazem i cynkiem. W przypadku srebra podkreśla możliwość wykorzystania nanocząstek srebra do rozwiązań biomedycznych, które uwarunkowane jest ich właściwościami fizykochemicznymi, zależnymi od metody syntezy. Omawiając kompleksy z żelazem podkreśla charakter LTF, należącej do metaloprotein wiążących żelazo niehemowe, których głównym zadaniem jest transport żelaza i regulacja jego homeostazy. Zwraca przy tym uwagę na problem konwersji żelaza, które z jednej strony jako Fe(II) aktywuje ditlenek z wytworzeniem bardzo reaktywnych form, które mogą powodować poważne procesy uszkodzeń oksydacyjnych, co uniemożliwia jego wykorzystanie jako dostępnego źródła żelaza, a z drugiej – jako Fe(III) charakteryzuje się małą rozpuszczalnością w warunkach fizjologicznych, co oznacza, że musi być związany z białkami lub innymi hydrofilowymi chelatorami. W przypadku jonów cynku, które zawierają wypełniony orbital d ( $d^{10}$ ) i dlatego nie biorą udziału w reakcjach redoks, wskazuje na ważne zmiany w sferze koordynacyjnej jonów. Według Autorki koordynacja ligandów wiążących  $Zn^{2+}$  choć jest trudna w roztworze o odczynie kwaśnym i obojętnym, jest możliwa w roztworze o pH 6.

W mojej opinii cenne było to zwięźle, a zarazem krytyczne przedstawienie przedmiotu badań, wystarczające dla zrozumienia zagadnień ważnych dla koncepcji i wyników rozprawy. Uważam jednak, że w rozdziale *Problem badawczy* streszczanie poszczególnych artykułów było niepotrzebne.

W kolejnym rozdziale Doktorantka formułuje cele badawcze i wypunktowuje w jaki sposób je zrealizowała. Nadrzędnym celem badawczym była synteza kompleksów LTF z wybranymi jonami metali d-elektronowych o znaczeniu biologicznym (Ag, Fe(III), Zn) oraz zbadanie ich właściwości i opis mechanizmów wiązania na podstawie danych uzyskanych z wykorzystaniem technik molekularnych oraz modelowania molekularnego. Dodatkowo, za cel pracy badawczej wyznaczyła sobie również zbadanie właściwości biologicznych zsyntetyzowanych kompleksów, tj. cytotoksyczność oraz działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Rozdział szósty zawiera zbiór 5 publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Zbiór ten otwiera artykuł przeglądowy pt. „*Silver nanoparticles: synthesis, investigation techniques, and properties*”, w którym przedstawiano metody syntezy nanocząstek srebra i ich charakterystykę. Jest to bardzo obszerna praca, powstała w oparciu o 255 pozycji piśmiennictwa, w której wskazano na kluczowe parametry syntezy nanocząstek i nanokompozytów srebra wpływające na ich fizykochemiczne i biologiczne właściwości. Zawarty opis podstaw bardzo dużej liczby technik instrumentalnych używanych w badaniach nanoukładów nie jest oryginalny, ale, co niezmiernie ważne, pozwolił na wskazanie ich wad i ograniczeń. Chronologicznie praca ta poprzedza pozostałe prace eksperymentalne ze zbioru ocenianych prac i choć nie ma charakteru eksperymentalnego, uważam, że jest jak najbardziej potrzebna: pozwoliła Doktorantce uporządkować posiadaną wiedzę i wytyczyć cele badawcze.

Zamiarem pierwszej pracy eksperymentalnej, zatytułowanej „*Synthesis, physicochemical characterization and antibacterial performance of silver-lactoferrin complexes*”, było określenie wpływu warunków syntezy srebra z laktoferyną bydlęcą (bLTF) na właściwości otrzymanych nanokompozytów. Zbadanie izoterm absorpcji pozwoliło przewidzieć właściwości fizykochemicznych takich nanokompleksów, które opisano wykorzystując techniki instrumentalne przedstawione w pracy przeglądowej. Za cenne w tej pracy uważam utworzenie funkcjonalizowanych nanokompozytów srebra o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec bakterii lekoopornych. Wykorzystanie takich układów w leczeniu zakażeń bakteryjnych ma więc duży potencjał aplikacyjny. Toksyczność nanokompozytów okazała się jednak porównywalna z toksycznością srebra. W tym momencie chciałabym prosić Doktorantkę, aby podczas publicznej obrony rozwinęła problem cytotoksyczności kompleksów Ag-LTF względem komórek eukariotycznych

W drugiej publikacji, pt. „*Synthesis and physicochemical characterization of bovine lactoferrin supersaturated complex with iron (III) ions*” opisano wyniki badań sorpcji jonów Fe(III) na bLTF. Za cenne w tej pracy uważam dobranie warunków syntezy homogennego kompleksu bLTF o dużej zawartości żelaza oraz właściwościach fizykochemicznych i biologicznych wskazujących na jego duży potencjał aplikacyjny jako suplementu diety. Wstępne badania dotyczące cytotoksyczności otrzymanych kompleksów wykazały, że nie są one bardziej toksyczne niż odpowiednie stężenie jonów Fe(III), podawanego w formie cytrynianu. Czy Doktorantka zamierza kontynuować te badania?

Trzecia i czwarta publikacja dotyczy tworzenia kompleksów cynku z bLTF i ludzką. W pracy zatytułowanej „*Synthesis and physicochemical characterization of zinc-lactoferrin complexes*” opisano wpływem pH i siły jonowej roztworu na skuteczność wiązania jonów  $Zn^{2+}$  do bLTF, a w pracy pt. „*Study on the zinc ions binding to human lactoferrin*” – mechanizm wiązania cynku do rekombinowanej LTF ludzkiej. Za ważne w tych obu pracach uważam opisanie mechanizmu wiązania jonów  $Zn^{2+}$  do LTF, co stanowi fundamentalny problem badawczy w chemii białek. Do weryfikacji poprawności opisu tego mechanizmu posłużyły Doktorantce zarówno wyniki przeprowadzonych eksperymentów laboratoryjnych, jak i te uzyskane z użyciem narzędzi chemii kwantowej, takich jak obliczenia kwantowo-mechaniczne i modelowanie molekularne.

Merytoryczną część rozprawy zamyka rozdział *Podsumowanie i wnioski* oraz streszczenie w j. polskim i angielskim. Rekapitułując kluczowe wnioski z przeprowadzonych przez siebie eksperymentów Doktorantka nie wspomina jednak o dalszych planach badawczych, opartych na otrzymanych wynikach. Szkoda, bo według mnie otrzymane biologicznie aktywne układy zasługują na dalsze badania aplikacyjne.

#### Poprawność redakcyjna rozprawy

Chociaż ogólny poziom rozprawy jest bardzo wysoki i wskazuje na dojrzałość naukową oraz kompletność warsztatu badawczego Doktorantki, krytyczny czytelnik może znaleźć w nim kilka wad, w większości drobnych, jak na przykład użycie jednostek długości spoza układu SI (str. 15<sup>13-14</sup> oraz str. 35<sup>12</sup>), nieprawidłowe nazewnictwo chemiczne i specjalistyczne – *związki niskocząsteczkowe* zamiast *związki małowcząsteczkowe* (str. 18<sup>12</sup> i str. 28<sup>4</sup>), *azotan srebra* zamiast

azotan(V) srebra (str. 29<sub>16</sub>), wolna energia Gibbsa zamiast energia swobodna Gibbsa (str. 30<sup>7</sup>), mostki dwusiarczkowe zamiast mostki disiarczkowe (str. 32<sub>14</sub>). Wśród błędów pisarskich są: „przeprowadzenie badań opisujące” zamiast „przeprowadzenie badań opisujących” (str. 12<sub>6</sub>), „LTF wykazują wysoką homologię” zamiast „LTF wykazuje wysoką homologię” (str. 5<sub>5</sub>), „W LTF występują N-glikozylacja” zamiast „W LTF występuje N-glikozylacja” (str. 16<sub>4</sub>), „miejsca N-glikozylacji” zamiast „miejsca N-glikozylacji” (str. 17<sup>1</sup>), „na ogół znane są co najmniej 20 różnych struktur” zamiast „na ogół znanych jest co najmniej 20 różnych struktur” (str. 18<sup>15-16</sup>), „rodzina *Enterobacteriaceae* produkują fimbrie typu 1” zamiast „rodzina *Enterobacteriaceae* produkuje fimbrie typu 1” (str. 22<sub>3</sub>), „zarówno natywna ludzka LTF, jak i jego fragmenty” zamiast „zarówno natywna ludzka LTF, jak i jej fragmenty” (str. 23<sub>8-9</sub>), „Pod czas” zamiast „podczas” (str. 26<sup>13</sup>), „większość wiązań w metalokompleksach są dużo słabsze” zamiast „większość wiązań w metalokompleksach jest dużo słabszych” (str. 26<sup>15</sup>), „w których kilka atomów żelaza łączą się ze sobą” zamiast „w których kilka atomów żelaza łączy się ze sobą” (str. 31<sub>11</sub>), „co wskazują na” zamiast „co wskazuje na” (str. 32<sup>11</sup>), „wiązaną jonów metali do badanych białek przechodzi w taki sam sposób” zamiast „wiązaną jonów metali do badanych białek zachodzi w taki sam sposób” (str. 34<sub>16</sub>). Wszystkie te drobne błędy i pomyłki nie obniżają wysokiej wartości rozprawy.

Na koniec Doktorantka przedstawia swój dorobek naukowy, który wykracza poza ramy tematyki związanej z rozprawą doktorską. Pani Oleksandra Pryshchepa jest współautorką łącznie 8 artykułów naukowych, charakteryzujących się bardzo dobrym współczynnikiem wpływu (sumarycznie IF = 35,739, pkt MEN = 940) oraz 2 rozdziałów w książkach, opublikowanych przez wydawnictwo Springer i PWN. Dodatkowo jest też autorką 15 komunikatów konferencyjnych oraz kierownikiem 5 i wykonawcą 1 projektu badawczego. Odbiła też szkolenie nt. cytometrii przepływowej w Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy i trzy staże przemysłowe w zakładzie mleczarskim w Grudziądzu. Cały dorobek Pani Oleksandry Pryshchepa jest więc bardzo bogaty, dalece powyżej średniego na tym etapie kariery.

#### Ocena końcowa

Po przeanalizowaniu zawartości merytorycznej przeprowadzonych i opublikowanych badań, a także roli jaką Pani mgr Oleksandra Pryshchepa w nich pełniła, nie mam wątpliwości, że

prezentowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani Oleksandry Pryshchepa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

#### Wniosek o wyróżnienie

Interdyscyplinarne badania naukowe przeprowadzone przez Panią mgr Oleksandrę Pryshchepa charakteryzuje duża wartość poznawcza i znaczący potencjał aplikacyjny. Bardzo wysoko oceniam zarówno syntezę kompleksów metal-LTF, jak i dobór szerokiego wachlarza metod do ich fizykochemicznej i biologicznej charakterystyki – zgodny ze światowymi standardami w badaniach takich układów – a także ich potencjał aplikacyjny. Wyniki badań, aspekt ich nowości oraz poprawność warsztatowa, zostały zweryfikowane poprzez ich opublikowanie w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Oleksandry Pryshchepa.

