

Prof. Piotr Młynarz  
Katedra Biochemii,  
Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wrocławska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wrocław

Wrocław, 11.04.2023 r.

## Recenzja

### **rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Pryshchepa zatytułowanej: *„Badania molekularne mechanizmów wiązania metali z białkami”***

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Pawła Pomastowskiego prof. UMK w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu, w grupie badawczej, która od lat wiedzie prym w kreowaniu nowoczesnej tematyki badawczej, a której twórcą był Pan prof. Bogusław Buszewski.

Od wielu lat inżynieria białkowa wraz z chemią bionieorganiczną stanowi ważny aspekt badań w kierunku tworzenia nowych materiałów, w kontekście mimetyków układów biologicznych, inżynierii materiałowej, układów transportujących jony metali oraz nanocząstki i leki. W szczególności zagadnienia te stają się ważne w świetle gospodarki o obiegu zamkniętym oraz wykorzystaniu białek, które są dostępne w skali przemysłowej, wśród których dobrym przykładem jest laktoferyna z mleka. Jednakże, aby białkowe produkty znalazły swoje zastosowanie na rynku np. w przemyśle mleczarskim, farmaceutycznym, czy też kosmetycznym potrzebne są najpierw badania podstawowe, które w ostatnim czasie wydają się pełnić drugorzędną rolę, chociaż w mojej opinii powinny pełnić rolę wprost nadrzędną. Tego typu badaniom poświęcona jest niniejsza praca doktorska, czyli charakterystyce oddziaływań jonów metali takich jak  $Ag^+$ ,  $Fe^{3+}$  oraz  $Zn^{2+}$  z białkiem laktoferyną.

Praca doktorska stanowi zbiór „spiętych” razem publikacji poprzedzonych następującymi rozdziałami: „Wprowadzenie”, „Obiekt badawczy”, „Problem badawczy”, „Bibliografia” oraz „Cele badawcze”. Na końcu dysertacji zostały umieszczone takie rozdziały jak: „Podsumowanie i wnioski”, „Streszczenie”, „Abstract” i „Dorobek naukowy” oraz „Oświadczenia”, całość pracy to 185 stron. W ostatnim czasie pojawia się coraz większa liczba prac o podobnym układzie, w którym wszystkie publikacje naukowe związane z tematyką dysertacji są już wydane, i w takiej właśnie formie załączone do rozprawy. Ten rodzaj pracy doktorskiej świadczy nie tylko o wysokim poziomie prowadzonych badań, ale również o bardzo dużym zaangażowaniu doktoranta w jej realizację.

Z punktu widzenia odbiorcy konstrukcja pracy jest prawidłowa. Najpierw Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z laktoferyną oraz możliwościami jej wykorzystania, następnie charakteryzuje w zwięzły sposób przedmiot badań poprzez opis struktury, glikozylacji, wybranych właściwości fizyko-chemicznych w tym wiązania jonów metali oraz biologiczną aktywność LTF. Ten ostatni podrozdział jest niewątpliwie ciekawy, ponieważ Autorka dysertacji opisuje w nim homeostazę mikroelementów, właściwości drobnoustrojowe LTF oraz jej możliwość regulowania procesów biologicznych.

Następnie Pani mgr Aleksandra Pryshchepa zdefiniowała cele badawcze, wśród których punktem docelowym była „synteza kompleksów laktoferyny z wybranymi jonami metali d-elektronowymi o znaczeniu biologicznym (srebro, żelazo(III), cynk), zbadanie ich właściwości oraz opis mechanizmów wiązania na podstawie danych uzyskanych przy wykorzystaniu technik molekularnych oraz modelowania molekularnego”. Do dodatkowych celów pracy należy zaliczyć zbadanie cytotoksyczności powstałych kompleksów oraz ich działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Cykl prac związanych z rozprawą doktorską otwiera przegląd literaturowy na temat syntezy nanocząstek srebra, możliwości użycia różnych metod i technik badawczych oraz opis właściwości AgNP. Moim zdaniem praca przeglądowa jest bardzo dobrym sposobem zapoczątkującym cykl badań, ponieważ umożliwi dogłębne zapoznanie się Doktorantki z tematem pracy doktorskiej i sprzyja dalszemu przemyślanemu rozwojowi prac badawczych.

W następnej pracy zostały opisane oddziaływania jonów  $Ag^+$  z laktoferyną wołową bLTF. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo bogaty warsztat badawczy, który zresztą w różnym stopniu został wykorzystany w następnych pracach. W badaniach zostały zastosowane takie techniki badawcze jak mikroskopia elektronowa, spektroskopia FTIR, spektroskopia Ramana, badania fluorescencyjne, spektrometria MALDI-TOF-MS, SDS-PAGE oraz elektroforeza kapilarna sprzężona z metodą ICP-MS. Dodatkowo zostały przeprowadzone toksykologiczne badania biologiczne. Analiza powstających kompleksów przeprowadzona za pomocą mikroskopii elektronowej wykazała w badanym materiale tworzenie się nanokompozytowych struktur typu metal-białko. Zastosowane metody spektroskopowe pozwoliły na określenie możliwych miejsc wiązania jonów srebra z udziałem takich reszt aminokwasowych jak kwas glutaminowy i asparaginowy, czy też łańcuchy boczne tryptofanu i metioniny. Badania mikrobiologiczne powstających nanokompozytów wykonane dla wybranych szczepów bakterii wykazały wyższe działanie przeciwbakteryjne, niż wolnych jonów srebra. Dodatkowo badania przeprowadzone na komórkach mysich fibroblastów linii L929 wykazały inhibujące działanie proliferacyjne kompleksów Ag-bLTF, podczas gdy jony  $Ag^+$  powodowały zmiany kształtu komórek na okrągły, charakterystyczny dla komórek apoptotycznych.

W następnej pracy Doktorantka opisała oddziaływania wołowej laktoferyny bLTF z jonami żelaza(III). Dowiedziono, że na jedną cząsteczkę bLTF przypada ok. 50 jonów tego metalu. Badania te mają znaczenie praktyczne, szczególnie biorąc pod uwagę bLTF jako cząsteczkę, która może być transporterem jonów metali w fortyfikowanych suplementach diety. Prace badawcze przeprowadzone na komórkach linii L929 oraz Caco-2 nie wykazały cytotoksyczności, z tego względu Autorzy pracy konkludując napisali, że otrzymane kompleksy Fe-LTF nie posiadają więcej negatywnych efektów, niż powszechnie używane suplementy diety zawierające jony żelaza.

W dalszym ciągu badań, w dwóch pracach naukowych zostały scharakteryzowane oddziaływania laktoferyny wołowej bLTF oraz rekombinowanej laktoferyny ludzkiej hLTF z jonami cynku. Praca ta, podobnie jak poprzednio opisana, ma znaczenie podstawowe opisując możliwość wykorzystania LTF jako transportera mikroelementów dla pacjentów cierpiących na niedobór tych pierwiastków. Przeprowadzone badania dowiodły, że w pH 6,0 nie zachodzi wiązanie się jonów cynku do białka, natomiast stabilne kompleksy zostały otrzymane w pH 7,4 oraz 8,6. Jako ciekawe zjawisko zostały opisane oddziaływania pomiędzy jonami cynku a białkiem, które były bardziej efektywne przy większym stężeniu jonów metali

oraz wyższym pH. Chociaż, ten drugi parament nie powinien być zaskakujący, ponieważ wraz ze wzrostem pH następuje, przede wszystkim, deprotonacja grup imidazolowych reszty histydylowej. Natomiast rzeczywiście ciekawym zjawiskiem jest zwiększenie miejsc wiązania cynku poprzez sukcesywne wiązanie się kolejnych jonów tego metalu do białka.

Opisywanie pracy doktorskiej z tzw. „spinki” oczywiście posiada dużo zalet, ponieważ praca jest już po recenzjach, jednakże w kontekście załączonego opisu chciałbym z obowiązku recenzenta zadać Doktorantce kilka pytań. Pierwsze, które mi się nasuwa to, czy zgodnie z definicją można mówić o sorpcji jonów metali na białku, czy nie jest bardziej uprawnione po prostu nazywaniem tego zjawiska wiązaniem jonów metali do białka? Drugie pytanie jest związane z możliwością wiązania jonów metali za pomocą glikanów znajdujących się na powierzchni białka, czy Pani rozważała taką możliwość? Chciałbym również zapytać Doktorantkę jak zgodnie z przytoczoną w pracy doktorskiej teorią miękkich i twardych zasad, i kwasów Lewisa opisać oddziaływanie pomiędzy jonami żelaza z grupami tiolowymi w ferredoksynie?

Podsumowując, Pani mgr Oleksandra Pryshchepa opanowała bardzo dobrze warsztat badawczy, w tym posługiwanie się wieloma metodami instrumentalnymi. Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczam wykazanie tworzenia się nanostruktur srebra z bLTF, opisanie działania kompleksów z jonami żelaza(III) oraz cynku z LTF, co może mieć znaczenie przy opracowywaniu suplementów diety bogatych w te mikroelementy.

W skład dysertacji doktorskiej Pani mgr Oleksandry Pryshchepy wchodzi cztery prace o łącznym współczynniku wpływu IF ponad 30, z których w trzech występuje jako autor wiodący. Natomiast do całkowitego dorobku naukowego należy zaliczyć jeszcze dodatkowo 10 prac. Jest to niewątpliwie imponujący dorobek naukowy zdobyty w latach 2019-2023 i w moim odczuciu świadczy o ponadprzeciętnym zaangażowaniu Doktorantki w prace badawcze macierzystej jednostki.

Już tradycyjnie również dodam, że nie mam w zwyczaju wskazywania, w pracy na błędy językowe czy edytorskie, ponieważ nie wpływają one na jej merytoryczną zawartość.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Oleksandry Pryshchepy spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, z późn. zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie niniejszej dysertacji doktorskiej.

Piotr Młynarz