



Poznań, 23.11.2023 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani **mgr Agnieszki Anny Rodzik**

p.t.: „**Badanie mechanizmów tworzenia nanokompozytów metal-białko jako potencjalnych środków przeciwdrobnoustrojowych**”

przygotowanej w na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK)

pod kierunkiem Promotora pracy

**prof. dr. hab., dr. h.c. multi. Bogusława Buszewskiego, czł. rzecz. PAN**

oraz Promotora pomocniczego – **dr. hab. Pawła Piotra Pomastowskiego, prof. UMK**

Chemia biologicznie aktywnych białek jest bardzo dynamicznie rozwijającą się specjalnością naukową, a prowadzone badania w jej zakresie mają multi- oraz interdyscyplinarny charakter. Poprawa różnorodności chemicznej na drodze wprowadzenia centrum metalicznego ma ogromne znaczenie w funkcjonowaniu wielu białek. Należy podkreślić, że w ostatnich latach dokonano znacznego postępu w tworzeniu specyficznych i bardziej biodostępnych indywiduów. Dlatego też przedłożona mi do oceny praca doktorska odzwierciedla poszukiwania nowych nanokompozytów białko-metal. Hipoteza badawcza zakłada opracowanie metodologii wytwarzania nanokompozytów wybranych jonów metali z białkiem serwatkowym  $\beta$ -laktoglobuliną (cynk i srebro) oraz białkami mleka –  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -kazeinami (cynk). Cele szczegółowe zrealizowano między innymi poprzez modyfikację białek mleka i serwatkowego jonami cynku i srebra, dogłębną fizykochemiczną charakterystykę otrzymanych układów, by w końcu zająć się opisem mechanizmu procesu immobilizacji, czy badaniem aktywności biologicznej wobec patogennych szczepów opornych na antybiotyki. Na koniec zostały przeprowadzone badania aplikacyjne wykorzystujące model zwierzęcy (myszy).

Recenzowana praca doktorska leży w zakresie badań prowadzonych przez Pana prof. dr. hab. Bogusława Buszewskiego – Promotora przedkładanej rozprawy doktorskiej, tj. w zakresie zagadnień z pogranicza chemii fizycznej, medycznej, analitycznej z uwzględnieniem chemii materiałowej, a nawet supramolekularnej czy kinetyki chemicznej.

Różnorodność zastosowań multi- i interdyscyplinarnych badań związana jest z jednej strony z rozpoznaniem chemicznym cząsteczek na drodze metod separacyjnych (chromatografia, techniki elektromigracyjne), jak i opracowaniem metod przygotowania próbki do analizy: wydzielania, wzbogacania, rozdzielania i oznaczania różnych indywiduów w skomplikowanych mieszaninach. Profesor B. Buszewski – jako renesansowy badacz – zajmuje się także pracami przebiegających na granicy świata zewnętrznego i wewnętrznego komórki, czyli na pograniczu *life sciences – life chemistry*. Obejmują one nie tylko tradycyjne dziedziny nauki jak chemia środowiska, biotechnologia, chemia medyczna, toksykologia, ale i nowoczesne tzw. „omiki”: proteomikę, genomikę oraz metabolomikę. Niniejsza praca doktorska jest doskonałym przykładem wpisania się w ten zakres badań, a więc bioanalitikę chemiczną, od początku uprawianą przez prof. Bogusława Buszewskiego.

Promotorem pomocniczym rozprawy jest Pan dr hab. Paweł Pomastowski, prof. UMK, którego udział w badaniach stanowiących podstawę rozprawy został jasno sprecyzowany w oświadczeniu przez niego przedłożonym. Jest on współautorem wszystkich publikacji będących podstawą recenzowanej dysertacji oraz autorem korespondencyjnym pracy P3, P4, P6, P7, Doktorantka z kolei jest autorem korespondencyjnym w przypadku pracy P5, zaś Promotor pracy w pozostałych przypadkach oraz pracy P7.

Niniejsza praca doktorska powstała m. in. w wyniku realizacji projektu OPUS14 – „Synteza kompleksowych związków srebra i cynku na bazie kazein i białek serwatki oraz nanocząstek srebra i tlenku cynku przez probiotyczne bakterie kwasu mlekowego”, Kierownik projektu – prof. UMK dr hab. Paweł Pomastowski, Promotor pomocniczy pracy doktorskiej oraz m.in. mgr Agnieszka Rodzik jako Wykonawca) i Preludium 19 - 2020/37/N/ST4/04082 („Wykorzystanie technik laserowej desorpcji/ionizacji wspomaganej matrycą oraz nanostrukturami w analizie hydrolizatów białkowych ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji potranslacyjnych”, Kierownik projektu mgr Agnieszka Rodzik) finansowanych z Narodowego Centrum Nauki oraz kilku (3) na badania w ramach prowadzenia prac naukowych na UMK.

Prawie dwustudwudziestostronicową rozprawę otwiera strona tytułowa, po której następuje tytuł w języku angielskim, dalej ulokowano zwyczajowo przyjęte podziękowania (w tym także za finansowanie badań naukowych) i spis treści. Merytoryczną część dysertacji rozpoczyna wykaz skrótów stosowanych przez Autorkę, który to poprzedza syntetyczny wstęp. Po prezentacji podstawowych informacji dotyczących problematyki badań („Wprowadzenie”), Pani mgr Agnieszka Rodzik formułuje cel badawczy, po czym koncentruje się na prezentacji wyników zawartych w cyklu ośmiu prac. Kończącą część dysertacji stanowią streszczenia, wykaz cytowanego piśmiennictwa (104 pozycje odzwierciedlające stan wiedzy gromadzonej głównie w minionym dwudziestoleciu) oraz informacje na temat osiągnięć naukowych Autorki. Należy wskazać, że sumaryczna liczba punktów ministerialnych za cykl ośmiu prac to 720, zaś IF=33,028, co daje bardzo dobry średni wynik IF na pracę ponad 4,1.

W części literaturowej opisano zagadnienia związane z białkami, w szczególności w powiązaniu z metodami badawczymi. W tej części przytoczono m.in. odniesienie do pracy P1, w której skupiono się na omówieniu technik analitycznych stosowanych w badaniu białek (praca przeglądowa). Jednym z kluczowych pomiarów jest ocena stabilności układów zawierających białka poprzez pomiar ich potencjału zeta. W pracach P2-P4 wyznaczono potencjał zeta w funkcji różnej wartości pH. Następnie omówiono zagadnienia oznaczania masy molekularnej białek, a prace P2 i P4 posłużyły do wyznaczenia profili molekularnych z wykorzystaniem techniki MALDI TOF MS (laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu).

Rozdział 3.2.1. zawiera ważne zagadnienia, związane z tematem przedłożonej pracy doktorskiej – opis mechanizmu wiązania białek z metalami i stanowi wstęp do charakterystyki wiązania, oceny mechanizmu i typu adsorpcji, a także kinetyki (szybkości) tegoż ostatniego procesu. Wyniki badań z prac P2, P3, P6 wykazały trzy etapy heterogenicznego procesu adsorpcji, a także, że kinetyka procesu wiązania cynku do frakcji kazeinowych różni się w porównaniu do  $\beta$ -laktoglobuliny. Ponadto w pracach P2, P4 i P6 stwierdzono, że model Freundlicha zapewnia lepsze dopasowanie do uzyskanych danych eksperymentalnych, zaś prace P2, P3, P6, P7 wykazały spontaniczność procesu sorpcji jonów cynku i srebra do badanych białek. W tym miejscu zabrakło mi dyskusji wpływu wielkości cząstek wyznaczonych np. metodą dyfrakcji laserowej (lub resonant mass measurement (RMM), flow imaging (FI)), albowiem należy się spodziewać wpływu wielkości cząstek na proces dyfuzji.

W kolejnym podrozdziale omówiono stosowane instrumentalne techniki do charakteryzacji otrzymanych w ramach przedłożonej pracy doktorskiej nanokompozytów (prace P2, P3, P4, P6, P7). Wykorzystano, oprócz już wcześniej wspomnianej techniki MALDI TOF MS, także spektroskopię w podczerwieni, Ramana, fluorescencyjną czy UV-Vis, czy techniki mikroskopowe (SEM i TEM). Następnie podjęto się oceny mechanizmu formowania się nanokompozytów z wykorzystaniem metod obliczeniowych (prace P6 i P7), w tym także metody dokowania molekularnego (P4).

W ostatniej części opisującej zagadnienia doświadczalne celem było zbadanie skuteczności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych kompleksów (praca P8). W szczególności oceniono wpływ układu Zn- $\beta$ -laktoglobulina i Ag- $\beta$ -laktoglobulina na gojenie się ran u myszy (badania aplikacyjne).

Tematyka rozprawy jest niezwykle aktualna, i to w wymiarze ogólnoświatowym, a Doktorantka wykazała się dużą umiejętnością prowadzenia złożonych i wielokierunkowych badań (także we współpracy z innymi osobami), co w efekcie pozwoliło na uzyskanie ważnych,

z naukowego punktu widzenia, korelacji, a także ważnych uogólnień. W odniesieniu do wspomnianego wcześniej planu pracy na uwagę zasługuje także przemyślane wskazanie sekwencji testów i technik, których wyniki dostarczają co najmniej kilku jakościowych parametrów badanych materiałów. Takie zestawienie działań świadczy o racjonalnym wykorzystaniu dostępnego zaplecza aparaturowego.

Do najważniejszych osiągnięć cyklu prac zaliczyć można:

1. Opracowanie metodyki wprowadzania (na drodze immobilizacji) jonów cynku i srebra do  $\beta$ -laktoglobuliny i jonów cynku do różnych frakcji kazeiny. Przeprowadzenie dogłębnej charakterystyki fizykochemicznej komplementarnymi technikami instrumentalnymi (od XRD, przez metody spektroskopowe, termiczne, aż po metody mikroskopowe).
2. Wykazanie heterogeniczności ww. procesu oraz zaproponowanie trzech etapów adsorpcji jonów metali do frakcji białkowych.
3. Zaproponowanie mechanizmu za pomocą którego jony metali wiążą się z białkami, w tym wykazanie (głównie metodami spektroskopowymi), że kluczową rolę w tym procesie odgrywają grupy karboksylowe kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz grupy fosforanowe w przypadku kazein
4. Opisanie po raz pierwszy mechanizmu formowania się nanokompozytów na bazie  $\beta$ -laktoglobuliny oraz różnych frakcji kazeiny w oparciu o metody obliczeniowe i dokowanie molekularne, w tym wskazanie miejsc wiązania. Zwrócenie także uwagi na wpływ stężenia i natury jonów metali na proces wiązania metalu z białkiem.
5. Wykazanie, że analizowane nanokompozyty posiadają właściwości antybakteryjne i spełniają wszystkie wymagania związane z bezpieczeństwem ich stosowania.

W tym miejscu chciałabym się zapytać jak widzi Pani możliwość komercjalizacji wyników? Jaką stabilnością długoterminową charakteryzują się nowe nanokompozyty?

Podsumowując, analiza danych przeprowadzonych doświadczeń dostarcza nowych informacji, wskazując równocześnie na integralność metodologii nauk chemicznych, w tym bioanalitikę chemiczną, w zakresie realizowanych zadań badawczych. Ponadto logiczny tok narracji dysertacji sprzyjają śledzeniu poszczególnych wątków opisywanych przez Autorkę. Pani mgr Agnieszka Rodzik napisała pracę w bardzo dobrym stylu, jednakże nie uniknęła niewielkich błędów (np. wpisanie odnośnika do podrozdziału 2.2 na str. 18).

Pragnę też zaznaczyć, że komentowane kwestie i prośby o dostarczenie dodatkowej informacji nie rzutują na moją jednoznacznie pozytywną i bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Rodzik. Recenzowana rozprawa reprezentuje bardzo dobry poziom naukowy.



Uznając walory merytoryczne ocenianej rozprawy, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane dysertacjom doktorskim stwierdzam, że w moim przekonaniu niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. z 2018r. poz. 1668).

Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Rodzik, do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Biorąc pod uwagę wymagania stawiane tego typu rozprawom z pełnym przekonaniem wnoszę o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Izabela Nowak