



Dr hab. inż. Tomasz Kobiela
Kierownik Laboratorium Badania Oddziaływań Biomolekularnych
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków
kobiela@ch.pw.edu.pl
<http://kobiela.ch.pw.edu.pl>

Warszawa, 24 czerwca 2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Sylwii Świątek
pt. „Funkcjonalne warstwy β -laktoglobuliny wołowej jako
perspektywiczne nośniki leków”**

Praca doktorska mgr inż. Sylwii Świątek zatytułowana „Funkcjonalne warstwy β -laktoglobuliny wołowej jako perspektywiczne nośniki leków” została zrealizowana Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera POLSKIEJ AKADEMII NAUK w Krakowie pod kierownictwem dr hab. inż. Barbary Jachimskiej, prof. IKiFP PAN.

Celem przedstawionej pracy była charakterystyka fizykochemiczna β -laktoglobuliny wołowej (LGB), optymalizacja procesu adsorpcji LGB na powierzchni złota oraz opracowanie konstruktów umożliwiającego zastosowania LGB jako nośnika bioaktywnych cząsteczek. Skuteczność tworzenia kompleksów białko-lek zweryfikowano poprzez efektywność immobilizacji w strukturze białka chlorowodoru tetrakainy.

Przeprowadzone badania wykazały również przydatność mikrowagi kwarcowej pracującej w trybie śledzenia dyssypacji energii (QCM-D) do badania kompleksów białka z wybranym ligandem, w tym przypadku chlorowodorkiem tetrakainy.

Podjęta w pracy tematyka znajduje się w ważnym nurcie nowoczesnych trendów badawczych w dziedzinie chemii biofizycznej.

Przedstawiona rozprawa doktorska obejmuje łącznie 111 stron. Stanowi zbiór czterech spójnych tematycznie, oryginalnych publikacji poprzedzonych wstępem stanowiącym przegląd literatury dotyczącej teoretycznych podstaw podjętej tematyki.

Załączone publikacje zostały opatrzone komentarzami dotyczącymi problemów i osiągnięć stanowiących tematykę opublikowanych badań. Cel pracy został wyczerpująco przedstawiony, uzasadniony i jest powtórzony jako teza pracy. W celu pracy przedstawiono szereg argumentów dotyczących podjęcia badanej tematyki, które raczej należą do wstępu. Stosowane techniki, metody analityczne i obliczeniowe omówiono w rozdziale metody eksperymentalne. Przedstawiony dorobek naukowy pozwala na stwierdzenie, że dotychczasowe osiągnięcia mgr inż. Sylwii Świątek na tym etapie kariery naukowej zasługują na wyróżnienie.

Dorobek publikacyjny obejmuje 9 prac, w tym 4 w których jest pierwszym autorem. Wszystkie prace są anglojęzyczne i opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wysoko należy również ocenić dorobek konferencyjny doktorantki obejmujący 8 prezentacji ustnych (w tym nagroda za najlepszy referat wygłoszony na Konferencji „NanoBioMateriały” – teoria i praktyka, Toruń, 02-03.06.2016) oraz 17 posterów (w tym nagroda za zajęcie II miejsca jako współautor posteru zaprezentowanego w trakcie konferencji 2nd Wrocław Scientific Meetings, Wrocław, 02.03.2018).

Ogólna ocena merytoryczna przedstawionej rozprawy jest bardzo pozytywna. Nieliczne uwagi dotyczące poszczególnych części zostaną przedstawione poniżej. We wstępie przedstawionego zbioru prac zostały omówione właściwości, struktura i zastosowanie β -laktoglobuliny wołowej jako nośnika biocząsteczek. Szczególną uwagę poświęcono identyfikacji parametrów środowiska zewnętrznego, determinujących zachowanie II i III-rzędowej struktury tego białka. Ta część rozprawy jest klarowna i dobrze udokumentowana. Pewien problem stanowi brak odniesienia do potencjalnego działania obcego białka jakim jest LGB (natywna lub zdenaturowana) na układ immunologiczny człowieka lub innych gatunkowo

zwierząt. W pracy Chun San Tai, Yi Yun Chen, and Wen Liang Chen “ *β -Lactoglobulin Influences Human Immunity and Promotes Cell Proliferation*” Biomed. Res. Int. 2016: 7123587, doi: 10.1155/2016/7123587, stwierdzono, że LGB nie działa na proliferację komórek, jeśli jest denaturowana. Natomiast może działać immunogennie (Halamoda-Kenzaoui B, Bremer-Hoffmann S., “*Main trends of immune effects triggered by nanomedicines in preclinical studies*”, Int. J. Nanomedicine, 2018;13:5419-5431. doi: 10.2147/IJN.S168808.

W pracy doktorskiej ten aspekt powinien być brany pod uwagę i omówiony.

W kolejnym rozdziale przedstawiono opis zastosowanych w badaniach metod eksperymentalnych: spektroskopii UV-Vis, dynamicznego rozpraszania światła, elektroforezy kapilarnej i mikrowagi kwarcowej pracującej w trybie śledzenia dyssypacji energii.

Rozdział ten został dosyć skrótowo potraktowany, co poskutkowało nie do końca ścisłym opisem w odniesieniu do ostatniej z wymienionych technik. Na stronach 20-21 napisano: „*Należy podkreślić, że w metodzie QCM-D mierzona jest całkowita masa zaadsorbowana na powierzchni sensora wraz cząsteczkami wody występującymi w warstwie adsorpcyjnej. Umożliwia to wyznaczenie stopnia hydratacji tworzonych warstw, co ma istotne znaczenie w przypadku badania układów biologicznych [51,52].*”

W rzeczywistości cząsteczki wody (lub innego rozpuszczalnika) mogą łączyć się z osadzoną na powierzchni warstwą poprzez hydratację lub też być uwięzione w jej wnętrzu. W takim przypadku osadzona warstwa zachowuje się jak lepkosprężysty „hydrożel”, powodując tym samym w badaniach techniką QCM-D nie tylko zawyżenie masy osadzonej warstwy (nawet do czterech razy więcej względem suchego związku) lecz również zmiany właściwości warstwy. Natomiast elipsometria czy SPR umożliwiają detekcję jedynie „suchej” masy na powierzchni. Zatem dopiero zestawiając te wyniki z QCM-D możliwa staje się analiza ilości zaadsorbowanej wody w osadzonej na powierzchni warstwie.

Analiza tego zagadnienia jest dobrze opisana w pracy twórców metody QCM-D (Hook i Kasemo et al. „*Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study*” *Anal. Chem.* 2001, 73, 5796-5804). Praca ta posiada 877 cytowań i powinna zostać zacytowana zamiast dwóch prac przeglądowych [50-51], cytowanych znacznie rzadziej, w których trudno się doszukać analizy wyżej opisanego zagadnienia.

Proszę o odniesienie się do tych uwag podczas obrony.

Rozdział 5 przedstawia dość wyczerpujący komentarz do załączonych do rozprawy publikacji. Obejmuje on opis określenia optymalnych warunków dla utworzenia funkcjonalnych warstw β -laktoglobuliny (wpływ parametrów środowiska zewnętrznego jak pH czy siła jonowa na proces adsorpcji białka). Otrzymane wyniki eksperymentalne zostały porównane z wynikami teoretycznymi uzyskanymi zgodnie z modelem losowej adsorpcji sekwencyjnej (RSA) dla cząsteczek o geometrii elipsoidy biorąc pod uwagę zarówno formę monomeryczną jak i dimeryczną białka. Potwierdzono w ten sposób, że obie izoformy tworzą na powierzchni złota monowarstwę o orientacji side-on w zgodności z wynikami otrzymanymi eksperymentalnie. Znajdujemy tutaj również bardziej szczegółowe informacje odnośnie sposobu charakteryzowania tworzenia kompleksów białko-lek (badania efektywności immobilizacji w strukturze LGB czynnika aktywnego, jakim jest chlorowodurek tetrakainy oraz określenie wpływu przejścia Tanforda na tworzenie aktywnego kompleksu zarówno dla izoformy A jak i mieszaniny izoform A+B). W rozdziale 6 zamieszczono krótkie podsumowanie oraz ogólne wnioski płynące z wykonanych w ramach pracy badań.

Pod względem formalnym praca spełnia warunki stawiane dysertacji na stopień doktora. Język rozprawy zarówno pod względem merytorycznym, jak i gramatycznym oraz stylistycznym jest poprawny poza pewnymi drobnymi

błędami gramatycznymi lub niewłaściwymi sformułowaniami, które jednak nie wpływają na ogólną pozytywną ocenę. Uważna korekta tekstu pozwoliłaby na uniknięcie tych niedociągnięć. Należy natomiast zwrócić uwagę, że dysertacja jest bardzo starannie przygotowana pod względem graficznym. Pewien niedosyt pozostawia również końcowa część pracy w postaci podsumowania i wniosków. Brakuje omówienia prowadzonych badań i ich wyników w szerszym kontekście naukowym. Autorka nie podejmuje próby przedstawienia roli jaką prowadzone przez nią badania mają dla rozwoju uprawianej dyscypliny naukowej i koncentruje się wyłącznie na badanym przez nią układzie.

Podsumowując stwierdzam, że autorka w przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazała się dobrą znajomością fizykochemii powierzchni oraz dużymi umiejętnościami doświadczalnymi. Autorka posługuje się również doskonale współczesną literaturą naukową w uprawianej dziedzinie o czym świadczą wyczerpujące cytowania najważniejszych publikacji doświadczalnych i teoretycznych.

Przedstawiona dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, zatem wnioskuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przeprowadzenie publicznej obrony pracy. W moim przekonaniu wartość naukowa uzyskanych wyników oraz jakość opracowania stanowi bardzo dobry wstęp do dalszej kariery naukowej mgr inż. Sylwii Świątek. Dlatego też wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

Tom KA