



# POLITECHNIKA ŁÓDZKA INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,

tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Kingi Mylkie

pt. „Nanocząstki magnetyczne funkcjonalizowane polisacharydami zawierającymi ugrupowanie kwasu boronowego do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny”

Magister Kinga Mylkie swoją pracę doktorską zatytułowaną „Nanocząstki magnetyczne funkcjonalizowane polisacharydami zawierającymi ugrupowanie kwasu boronowego do wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny” wykonała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w Katedrze Chemii Biomedycznej i Polimerów pod opieką dr hab. Marty Ziegler-Borowskiej.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy opracowania modyfikowanych kwasami boronowymi nanocząstek magnetycznych zdolnych do selektywnego wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny. Materiały zdolne do wiązania tego białka mogą być zastosowane do opracowania testów diagnostycznych oraz wyznaczania parametrów substancji czynnej. A idąc dalej i biorąc pod uwagę fakt, że wirusy zawierają białka określane jako glikoproteiny otoczki, materiały te mogłyby również znaleźć zastosowanie w diagnostyce zakażeń wirusami jak również w poszukiwaniu nowych leków przeciwwirusowych.

Podjęty temat badawczy wpisuje się we współczesne obszary badawcze dotyczące nanotechnologii, która jest interdyscyplinarnym działem nauki, zajmującym się projektowaniem i tworzeniem struktur nanocząsteczek, których wielkość mieści się w zakresie 5-100 nm. Nanotechnologia należy do jednej z najpopularniejszych obecnie dziedzin nauki a jej rozwój ma ogromne znaczenie w wielu obszarach, w tym w farmacji i medycynie. W nanofarmacji nanocząstki służą jako nośniki substancji terapeutycznych, umożliwiając celowaną terapię dzięki opłaszczeniu ligandami, które łączą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek zmienionych chorobowo, a także są używane w badaniach obrazowych do detekcji zmian chorobowych. Z tego względu nanocząsteczki doskonale nadają się do diagnostyki i terapii różnych chorób, co umożliwia wcześniejsze wykrycie zmian patologicznych i skuteczniejsze leczenie pacjentów. Istotnym problemem w obecnej terapii, w szczególności terapii przeciwnowotworowej jest brak specyficzności w stosunku do komórek nowotworowych, co powoduje cytotoksyczność również w stosunku do

prawidłowych komórek oraz pojawienie się lekooporności. Ponadto ograniczona jest możliwość monitorowania odpowiedzi terapeutycznej pacjenta podczas leczenia. Nanotechnologia daje więc ogromne możliwości w pokonaniu ograniczeń konwencjonalnej terapii przeciwnowotworowej. Opracowywane są różne formy i struktury nanokompozytów, które mogą być specyficznie wykorzystywane do leczenia nowotworów nie tylko za pomocą chemioterapii, ale także radioterapii oraz terapii fotodynamicznej lub termicznej. Tak więc bez wątpienia, praca doktorska mgr Kingi Mylkie, wpisuje się w intensywnie rozwijany dział nauki i jest aktualna.

Praca posiada wielopoziomową strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań.

Celem głównym pracy było zaprojektowanie i otrzymanie sfunkcjonalizowanych nanocząstek magnetycznych zdolnych do selektywnego wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny (AGP). Białko AGP oraz albuminę surowicy krwi ludzkiej (HSA), można traktować jako biomarkery obecne w krwi, które związane są z obecnością, rozwojem i przebiegiem chorób.

Tak ambitny i złożony cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych, obejmujących: 1) opracowanie metod syntezy puli polisacharydów i sprawdzenie ich właściwości; 2) opracowanie metod wytwarzania nanocząstek magnetycznych pokrytych modyfikowanymi polisacharydami i sprawdzenie ich właściwości; 3) sprawdzenie zdolności wiązania glukozy przez modyfikowane polisacharydami i kwasami boronowymi opracowane i otrzymane materiały; 4) sprawdzenie, czy opracowane warunki wiązania glukozy mogą być zastosowane do efektywnego wiązania alfa-1-kwaśnej glikoproteiny przez modyfikowane nanocząstki magnetyczne. W moim przekonaniu zasadne byłoby wypunktowanie głównych celów szczegółowych (poszczególnych etapów badań).

Recenzowana praca liczy 228 stron. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje wykaz stosowanych skrótów, wstęp, część literaturową, cel pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, podsumowanie i wnioski, streszczenie oraz wykaz literatury cytowanej. W moim przekonaniu spis treści nie jest czytelny. Główne rozdziały: wstęp, część teoretyczna, część eksperymentalna, wyniki i dyskusja powinny być lepiej widoczne w spisie treści. Również, cel i założenia pracy oraz podsumowanie, streszczenie i literatura cytowana powinny znaleźć się w grupie głównych składowych pracy. W pracy zabrakło wykazu dorobku naukowego Doktorantki.

Przegląd literaturowy nazwany przez Doktorantkę „Część teoretyczna” obejmuje podrozdziały dotyczące: budowy i funkcji białek, ze szczególnym uwzględnieniem

glikoprotein, magnetycznych nanocząstek, gdzie Doktorantka omówiła metody otrzymywania nanocząstek magnetycznych, metody funkcjonalizacji nanocząstek magnetycznych, metody charakteryzowania nanocząstek magnetycznych, w tym zastosowanie chitozanu i skrobi do pokrywania nanocząstek magnetycznych oraz zastosowanie kwasów boronowych do ich modyfikacji. z uwzględnieniem metod ich tworzenia. Rozdział ten liczy 45 stron i zawiera aż 154 odnośniki literaturowe. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymana jest spójność dzięki starannemu doborowi referowanych publikacji i konsekwentnemu podporządkowaniu wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Doktorantce niestety nie udało się uniknąć błędów w tej części pracy. Przykładowo: na stronie 21 Doktorantka pisze o amidowym azocie asparaginianu, to jest amidowy azot asparaginy. Asparaginian to albo ester kwasu asparaginowego albo sól tego kwasu. Błąd jest również na Rysunku 13. Hydrazydy to grupa organicznych związków chemicznych, o ogólnym wzorze:  $R-CO-NH-NH_2$ . Na rysunku przedstawione są hydrazony – grupa organicznych związków chemicznych o ogólnym wzorze:  $R_1R_2C=NNH_2$ . Związki te otrzymuje się w reakcji kondensacji aldehydów lub ketonów z hydrazyną. Z kolei na Rysunku 1, przedstawiony jest dipeptyd złożony z dwóch reszt glicyny, a nie jak piszę Doktorantka glicyny i alaniny. Mało precyzyjne jest sformułowanie „komórka receptorowa”.

Proszę o omówienie stabilizacji struktur drugorzędowych białek w trakcie obrony pracy doktorskiej, czy rzeczywiście jedynie grupa aminowa oraz karboksylowa aminokwasów uczestniczy w procesie tworzenia trwałych struktur helikalnych oraz  $\beta$ -kardki?

Kolejny główny rozdział przedstawia cel pracy, który został przygotowany precyzyjnie. Wprowadzenie struktur zaplanowanych do otrzymania modyfikowanych polisacharydów ułatwia śledzenie tekstu.

Kolejny rozdział główny „Część eksperymentalna” zawiera opisy metod badawczych. Część ta opisana jest dokładnie, co pozwala na odtworzenie uzyskanych wyników. Na pochwałę zasługuje bardzo dokładna charakterystyka otrzymanych związków. Moje obawy budzi metoda otrzymywania amidowych pochodnych karboksymetylochitozanu (rozdział 12.6). Według opisu reakcja tworzenia amidu zachodziła pomiędzy karboksymetylochitozaniem i kwasem 3-aminofenyloboronowym w temperaturze  $55^\circ\text{C}$ . Czy nie stosowano żadnego odczynnika kondensującego? Mało prawdopodobne wydaje się utworzenie wiązania amidowego w opisanych warunkach. Podobnie jest w opisie w rozdziale 14.7. W rozdziałach tych w strukturze finalnych materiałów jest błąd, pokazana jest

cząsteczka wywodząca się z kwasu 4-aminofenyloboronowego. Mam również uwagi dotyczące błędów w numeracji poszczególnych podrozdziałów.

Najbardziej rozbudowana część pracy to rozdział szósty „Wyniki i dyskusja” Rozdział liczy 100 stron. W pierwszym etapie prac badawczych Doktorantka opracowała metody syntezy i dokonała charakterystyki modyfikowanych polisacharydów. Doktorantka otrzymała dziewięć materiałów polisacharydowych zawierających resztę kwasu boronowego. Warto podkreślić, że siedem z nich stanowiło nowe materiały polisacharydowe dotychczas nie opisane w literaturze. Do charakterystyki wytworzonych modyfikowanych polisacharydów Doktorantka zastosowała spektroskopię NMR, ATR-FTIR, zaś morfologię materiałów oceniała stosując technikę SEM. Dodatkowo wykonana została też analiza właściwości hydrofilowo-hydrofobowych modyfikowanych polisacharydów oraz ich właściwości termiczne. Przeprowadzone badania pozwoliły na poznanie właściwości modyfikowanych polisacharydów, co pozwoliło Doktorantce na projektowanie nowych materiałów opartych na cząstkach nanomagnetycznych pokrytych modyfikowanymi polisacharydami. W kolejnym etapie badań Doktorantka otrzymała dziewięć nowych, nieopisanych dotychczas w literaturze nanocząstek magnetycznych pokrytych otrzymanymi polisacharydami modyfikowanymi kwasami boronowymi. Do określenia skuteczności syntezy oraz zbadania właściwości nowych materiałów magnetycznych Doktorantka zastosowała metody: FTIR, SEM, TEM oraz DLS. To co ważne, Doktorantka stwierdziła, że we wszystkich przypadkach rozmiar nanocząstek magnetycznych nie przekraczał 50 nm, zaś w oparciu o badania XRD potwierdziła, że na etapie syntezy nie dochodzi do zmiany struktury rdzenia magnetycznego.

Wszystkie modyfikowane kwasami boronowymi polisacharydy zostały zastosowane do badań wiązania glukozy. Doktorantka wykazała, że wszystkie modyfikowane polisacharydy posiadają zdolność wiązania glukozy. Najwyższe powinowactwo do glukozy obserwowano dla karboksymetyloskrobi modyfikowanej kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMS-PBA) oraz karboksymetylochitozanu modyfikowanego kwasem 3-aminofenyloboronowym (CMCsPBA). Natomiast dla diadehydowych pochodnych skrobi i chitozanu Doktorantka obserwowała najniższe wiązanie glukozy. Proszę o wyjaśnienie, co mogło być przyczyną tak zróżnicowanej zdolności wiązania glukozy przez te polisacharydy. Dla wszystkich zsyntezowanych nanocząstek magnetycznych pokrytych modyfikowanymi polisacharydami zbadano również zdolność wiązania  $\alpha$ -1-kwaśnej glikoproteiny. Również w tym przypadku największą zdolność wiązania Doktorantka stwierdziła dla polisacharydów karboksymetylowanych (CMS-PBA oraz CMCsPBA). Dodatkowo Doktorantka w oparciu o badania Microtox wykazała, spadek żywotności *Aliivibrio fischer* powyżej 20%, co wskazuje

na ich właściwości bakteriobójcze. O ile w przypadku chitozanu powszechnie znana jest jego aktywność przeciwbakteryjna, to w przypadku skrobi nie jest to już tak oczywiste. Proszę o wyjaśnienie, z czego może wynikać aktywność przeciwbakteryjna materiałów opartych o skrobię.

Podrozdział Wnioski oraz Streszczenie przygotowane są poprawnie. Na docenienie zasługuje również szata graficzna rozprawy doktorskiej.

Imponujący jest również zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmujący 199 pozycji.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych oraz sprawność w posługiwaniu się złożonymi, współczesnymi technikami analitycznymi, które to Doktorantka potrafiła zaimplementować w badaniach. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na dorobek publikacyjny mgr Kingi Mylkie składa się 12 publikacji z listy JCR. Jedna z nich bezpośrednio związana jest z rozprawą doktorską. Doktorantka jest pierwszym współautorem w tej jednej publikacji stanowiącej podstawę recenzowanej pracy doktorskiej. Dodatkowo Doktorantka jest również współautorem 39 komunikatów prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, z czego 13 jest bezpośrednio związanych z pracą doktorską.

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Kingi Mylkie. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki.

Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Kingi Mylkie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska

Łódź, 28. 03. 2024