



Olsztyn, 6 marca 2025 r.

dr hab. Mariusz Szabelski, prof. UWM
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
ul. Michała Oczapowskiego 4
10-719 Olsztyn

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Mariki Grodzickiej
zatytułowanej:**

**„Charakterystyka biofizyczna i ocena właściwości biologicznych polifenolowych
dendrymerów modyfikowanych kwasem kawowym”**

wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Maksima Ionova (promotora) i Pani dr hab. Sylwi Michlewskiej (promotora pomocniczego) w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego.

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku Donald Tomala wraz z zespołem po raz pierwszy użył określenia „dendrymer” oraz opisał metodę syntezy tych nanocząstek. Dendrymery są polimerami sferycznymi o unikalnej strukturze i właściwościach fizykochemicznych. Dzięki silnie rozgałęzionej budowie posiadają charakterystyczne wolne przestrzenie, w których można umieszczać różne substancje i wykorzystywać między innymi jako transportery genów oraz leków. Obecnie w wielu renomowanych ośrodkach naukowych na świecie prowadzone są badania nad syntezą modyfikowanych w różny sposób dendrymerów mających na celu otrzymanie nanocząstek o niskiej toksyczności. W nurt tych badań doskonale wpisuje się rozprawa doktorska Pani mgr. Mariki Grodzickiej. Doktorantka do swoich badań wykorzystwała cztery dendrymery w różnym stopniu modyfikowane kwasem kawowym i glikolem polietylenowym. Wykonała szereg doświadczeń z wykorzystaniem różnych technik w celu zbadania ich właściwości biofizycznych i biologicznych pod kontem potencjalnego wykorzystania tych nanocząstek w medycynie.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem w formie spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR. Przedstawione w doktoracie badania były realizowane i finansowane w ramach aż pięciu projektów naukowych i przy współpracy z pięcioma grupami badawczymi. Układ rozprawy doktorskiej jest charakterystyczny dla dysertacji przygotowanej w formie popularnie nazywanej „zszywką”. Doktorantka w części poprzedzającej cztery artykuły naukowe wymienia źródła finansowania i instytucje naukowe biorące udział w badaniach, opisuje swoje badania, przedstawia swój dorobek naukowy, działalność naukowa i organizacyjną oraz nagrody i wyróżnienia. W następnej części doktorantka załączyła publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i na koniec oświadczenia współautorów.

Najważniejsza część opisująca osiągnięcie naukowe została zawarta na niecałych dziesięciu stronach (pomijając skróty, streszczenia w języku polskim i angielskim i bibliografię). Bardzo skrótowo zostały opisane metody oraz ogólnikowo publikacje poświęcając około jedną stronę każdej. Prezentując publikacje Doktorantka powinna się skupić na wykonanych przez siebie badaniach i omówić je w kontekście całości uzyskanych wyników. Dodatkowo może w tym miejscu umieścić dużo więcej szczegółów, danych czy rysunków niż w publikacji. Pisanie publikacji rządzi się swoimi prawami i ograniczeniami narzuconymi przez czasopisma. Bardzo często pisząc manuskrypt musimy ograniczyć liczbę np. rysunków, tu takich ograniczeń nie ma. W publikacjach oraz we wstępie brakuje istotnych informacji i danych o czym wspominam poniżej. Takie bardzo ogólnikowe omówienie utrudnia recenzentowi ocenę osiągnięcia naukowego Doktorantki mającego stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są wieloautorowe a ich liczba waha się od 7 do nawet 10 współautorów. Taka bardzo ogólna forma opisanie osiągnięcia byłaby zrozumiała, gdyby autorami prac byli jedynie Doktorantka i Promotorzy. Na szczęście sytuację ratują oświadczenia współautorów oraz Doktorantki określające udział poszczególnych osób w powstaniu publikacji. Na podstawie tych oświadczeń można stwierdzić, że udział Pani mgr. Mariki Grodzickiej był dominujący i wynosił w trzech pracach ponad 60% a tylko w jednej ponad 50%.

Rozprawa napisana jest poprawnym językiem i dobrze się ją czyta. Niestety Doktorantka nie uniknęła paru wpadek i błędów. Na stronie 7 używa błędnego określenia „ładunek kationowy” – nie ma czegoś takiego, ładunek może być dodatni, ujemny, cząstkowy itd., ale nigdy nie kationowy. Myślę, że ten błąd pojawił się zapewne z pewnego skrótu myślowego. Dalej na tej samej stronie i dalszych Doktorantka niewłaściwie używa słowo „koniugacja” np. „*Jednym ze sposobów zmniejszenia toksyczności dendrymerów kationowych*

jest ich koniugacja z glikolem polietylenowym (PEG)” lub w zdaniu „W związku z tym, że niektóre z polifenoli, nie są łatwo biodostępne, ich koniugacja z dendrymerami stanowi korzystne rozwiązanie...”. Powinno się stosować określenia np. zmodyfikowano, dołączono itp. Pozostałe drobne niedociągnięcia i błędy pominę.

Przechodząc do oceny merytorycznej wyników pracy Pani mgr. Mariki Grodzickiej chciałbym wyrazić swoje zastrzeżenia do badań fluorescencyjnych wykonanych przez Doktorantkę, które przedstawiam je poniżej.

Przed przystąpieniem do badań spektroskopowych opisanych w publikacjach należało dokonać charakterystyki spektralnej dendrymerów. Wszystkie cztery zastosowane nanocząsteczki posiadały w swej strukturze kwas kawowy. Powszechnie wiadomo, że kwas kawowy podobnie jak inne związki z grupy polifenoli posiada charakterystyczne widmo absorpcji i fluorescencji. Dodatkowo kształt i położenie widm zależą od polarności otoczenia. Pasma absorpcji kwasu kawowego obserwujemy w zakresie od około 260 nm do nawet 380 nm, natomiast widmo fluorescencji od 360 nm do 600 nm. Należy więc się spodziewać, że badane dendrymery również będą posiadały charakterystyczne widmo absorpcji i fluorescencji. Na domiar złego zakresy, w których absorbuje i emituje światło kwas kawowy pokrywają się z przedziałami interesującymi Doktorantkę podczas badań fluorescencyjnych.

Brak jest informacji w jakiej konfiguracji następowało wzbudzenie i obserwacja próbek podczas wszystkich badań fluorescencyjnych (gaszenie fluorescencji, pomiary polaryzacyjne i anizotropii) oraz w jakiej kuwecie. Na podstawie przedstawionych wyników mogę się jedynie domyślać, że we wszystkich pomiarach stosowano kuwetę 1x1cm oraz wzbudzenie i obserwację w konfiguracji L, czyli pod kątem prostym. Taka informacja jest niesłychanie ważna ze względu na możliwość pojawienia się pewnych efektów wpływających na poprawność uzyskanych wyników (w dalszej części rozwinę myśl).

W publikacji M. Grodzicka, S. Michlewska, A. Buczkowski, S. Sekowski, C. E. Pena-Gonzalez, P. Ortega, F. J. de la Mata, J. Błasiak, M. Bryszewska, M. Ionov; A new class of polyphenolic carbosilane dendrimers binds human serum albumin in a structure-dependent fashion, Sci. Rep, 14:5946, 2024, <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56509-0> w materiałach i metodach Doktorantka opisując pomiary fluorescencyjne napisała zdanie: *„Fluorescence spectra of albumin were corrected for the proper baselines”*. To stwierdzenie jest całkowicie niezrozumiałe dla mnie. Chyba autorka pomyliła metody, a mianowicie pomiary widm emisji z pomiarami widm absorpcji. Absorbancja jest wielkością addytywną a widmo absorpcji pokazuje stan podstawowy, dlatego też widma absorpcji możemy korygować na tzw. linię bazową, czy też odejmować widma poszczególnych składników. Widma emisji fluorescencji

reprezentują stan wzbudzony, w którym mogą zachodzić różne procesy jak np. tworzenie kompleksów, transfer energii, reakcje fotochemiczne itd., dlatego też nie korygujemy widm emisji na tzw. „baselines”.

Nie rozumiem, dlaczego nie wykonano pomiarów widm absorpcji wszystkich próbek w badaniach wygaszania fluorescencji. Na podstawie widm absorpcji można było dokonać korekty wyników na filtr wewnętrzny. Na podstawie pokazanych widm fluorescencji oraz właściwości kwasu kawowego można wnioskować, że mamy silny efekt filtru wewnętrznego. Doktorantka nie dokonała korekty i tak naprawdę te zmiany w intensywności pasma tryptofanu pokazane w pracy są głównie efektem filtru wewnętrznego, czyli wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek (stężenie dendrymerów rośnie 10 razy) maleje liczba wzbudzanych cząsteczek białka. Tylko część jest wzbudzana efektywnie a do pozostałych nie dociera promieniowanie wzbudzające. Widać to doskonale na rysunku przedstawiającym gaszenie dendrymerów modyfikowanych jedynie kwasem kawowym. Na początku widma, w okolicach 305 nm widoczne jest fragment rozproszenia Rayleigha (tak zwana pierwsza harmoniczna), wraz ze wzrostem ilości rozpraszacza (dendrymeru) powinno ono rosnać jednak na rysunku widać spadek co oznacza, że światło wzbudzające nie dociera do gębi roztworu. Dodatkowo z badań dla dendrymerów modyfikowanych PEG widać bardzo ciekawe zjawisko potwierdzające, że badane dendrymery posiadają pasmo absorpcji w rejonie wzbudzenia i właściwości spektroskopowe kwasu kawowego silnie zależą od polarności otoczenia. Wprowadzenie PEG do cząstki powoduje odsunięcie kw. kawowego od środka dendrymeru, co powoduje drastyczną zmianę mikrootoczenia a to wpływa na widmo absorpcji i fluorescencji kwasu kawowego. I tak dla dendrymerów modyfikowanych PEG nie widać już rozproszenia w okolicach 305 nm, ponieważ te dendrymery mają dużo większe molowe współczynniki absorpcji niż te bez PEG. Wynika to z podstaw fizyki. Doktorantka wykonała wszystkie pomiary gaszenia fluorescencji przy takich samych ustawieniach aparatury pomiarowej i dla tych samych stężeń wszystkich składników. Natężenie światła padającego na próbkę musi się równać sumie natężeń światła w zjawiskach zachodzących w próbce, czyli światłu odbitemu, rozproszonemu, pochłoniętemu i przepuszczonemu przez próbkę. Skoro układ jest praktycznie taki sam (cząsteczki rozpraszacza mają bardzo podobną wielkość), to jeśli maleje nam ilość światła rozproszonego to musi rosnać ilość światła pochłoniętego. Dodatkowo widać, że w próbce mamy dwa obiekty świecące białko i dendrymer, przy czym najsilniej świeci dendrymer modyfikowany PEG zawierający dwie cząsteczki kwasu kawowego. To co Doktorantka błędnie opisuje jako przesunięcie pasma jest

niczym innym jak widmem fluorescencji dendrymeru pojawiającym się wraz ze wzrostem jego stężenia w próbce.

Pominę dyskusję na temat interpretacji wyników uzyskanych z pomiarów gaszenia fluorescencji (wykresy, K_{SV} , k_q , $\log K_b$), które w związku z powyższymi stwierdzeniami są po prostu błędne. Wspomnę jedynie, że na podstawie tylko pomiarów widm nie można stwierdzić jaki mamy mechanizm gaszenia fluorescencji. To czy występuje gaszenie statyczne, dynamiczne lub mieszane można potwierdzić wykonując pomiary czasowo-rozdzielcze, czyli pomiary zaników fluorescencji i wyznaczenie czasów życia w stanie wzbudzonym. Takich pomiarów Doktorantka nie wykonywała jest więc nieuprawnione stwierdzenie zawarte w pracy, że występuje tu gaszenie statyczne.

Dodatkowo nie zrozumiałe jest dla mnie czym kierowała się Doktorantka decydując się na wzbudzenie 295 nm. Albumina ludzka (HSA) zawiera w swej strukturze tylko jeden tryptofan i aż 18 tyrozyn. Celem Doktorantki było wykazanie oddziaływań pomiędzy dendrymerami i białkiem a nie sprawdzenie co się dzieje jedynie z tryptofanem. Naturalnym zatem wyborem powinno być wzbudzenie 280 nm, którym wzbudzimy wszystkie interesujące nas aminokwasy: 18 Tyr i 1 Trp. Zarówno Tyr jak i Trp są czułe na zmianę mikrootoczenia, w związku z tym ich widmo fluorescencji ulegałoby zmianie wraz ze zmianą konformacji białka. Wybór takiego wzbudzenia dostarczyłby Doktorantce dużo więcej informacji i dodatkowo intensywność fluorescencji byłaby dużo większa co przy takich samych nastawach szczelin fluorymetru pozwoliłoby znacząco obniżyć stężenie białka w próbce a co za tym idzie również dendrymerów. Efekt filtru wewnętrznego może wtedy nie byłby aż tak duży, oczywiście można byłoby to ocenić jedynie oglądając widma absorpcji, których nie ma.

Kolejne wątpliwości mam w stosunku do pomiarów anizotropii fluorescencji. Najprawdopodobniej również dla tych pomiarów ujawnia się efekt filtru wewnętrznego. Widoczny jest wyraźny spadek wartości stosunku r/r_0 dla dużych stężeń dendrymerów, który może wynikać z obniżenia sygnału fluorescencji z powodu filtru wewnętrznego. Doktorantka zastosowała te same stężenia nanocząstek jak w przypadku doświadczeń omówionych powyżej (gaszenie fluorescencji). Dodatkowo podczas pomiarów anizotropowych obserwacja sygnału emisji fluorescencji dwóch sond fluorescencyjnych pokrywa się z zakresem, w którym kwas kawowy wykazuje fluorescencję przez co tak naprawdę nie wiadomo co Doktorantka zmierzyła. W mojej ocenie ten eksperyment został źle zaprojektowany (zły dobór sond fluorescencyjnych) a wszystko z powodu braku badań charakterystyki spektroskopowej dendrymerów na samym początku.

W części dotyczącej pomiarów polaryzacyjnych Doktorantka nie podała równania jakie wykorzystwała do obliczenia polaryzacji oraz w opisie osi Y na rysunku brakuje informacji, że są to wartości P/P_0 .

Na koniec mam do Pani mgr. Mariki Grodzickiej prośbę o omówienie jaki wpływ na poprawność pomiarów dichroizmu kołowego ma rozproszenie pojawiające się w próbkach zawierających dendrymery.

Podsumowując, chciałbym zaznaczyć, że moje uwagi krytyczne zawarte w niniejszej recenzji odnoszą się jedynie do badań spektroskopowych a nie do całości materiału zawartego w publikacjach i nie umniejszają końcowej ocenie doktoratu. Na pochwałę zasługuje zastosowanie w badaniach wielu różnorodnych metod eksperymentalnych dostarczających wyników wzajemnie się uzupełniających i finalnie tworzących jedną całość. Przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską oceniam pozytywnie. Pani mgr. Marika Grodzicka wykonała szereg różnorodnych eksperymentów i bez wątpienia potwierdziła słuszość stawianej hipotezy badawczej. Oprócz oceny samej rozprawy doktorskiej na uwagę zasługuje również bogaty dorobek Doktorantki świadczący o jej dużym zaangażowaniu w pracę naukową i pracowitości.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr. Mariki Grodzickiej, przygotowana pod opieką Pana prof. dr hab. Maksima Ionova (promotora) i Pani dr hab. Sylwi Michlewskiej (promotora pomocniczego), stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka rozprawy spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Mariki Grodzickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



dr hab. Mariusz Szabelski, prof. UWM