

Warszawa, 26.02.2018 r.

Prof. dr hab. Dorota Maciejewska
Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1, 02 097 Warszawa

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Joanny Czulak

Synthesis of Molecularly Imprinted Polymers – catalytic properties of obtained materials
(PL: Polimery z odciskiem molekularnym – właściwości katalityczne otrzymanych układów)

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z trzech niezależnych rozdziałów, które łączy katalityczny potencjał otrzymanych materiałów. Obejmuje 12 sekcji o różnej objętości przedstawionych na 183 stronach. Doktorantka zdecydowała się na układ pracy, w którym dyskusja wyników poprzedzona jest opisem eksperymentów dla wszystkich trzech części pracy. Chociaż taki sposób jest preferowany w wielu czasopismach naukowych, w pracy doktorskiej obejmującej tak zróżnicowane badania (a jednocześnie operującej tymi samymi substancjami), zmusza czytającego do wielokrotnego powracania do wybranych sekcji i podsekcji, aby właściwie ocenić cel, metodologię i zakres przeprowadzonych badań. Rozdziały różnią się zakresem dyskusji. Zwłaszcza sekcja 9.3. HRP-imprinted particles jest ujęta bardzo schematycznie w porównaniu z sekcją 9.2. HRP-bioimprinting – results. Pracę rozpoczyna Abstract, natomiast cel pracy podany jest dopiero na stronie 47 (Sekcja 6. Aim of the project) już po przeglądzie piśmiennictwa (Sekcja 5. Literature review). Taki układ jest akceptowalny, ale podanie celu pracy na początku dysertacji pozwala lepiej ocenić zawartość części literaturowej już podczas pierwszego czytania. Praca jest napisana w języku angielskim, więc uważam, że powinna zawierać abstrakt w języku polskim (przez analogię do konieczności umieszczania abstraktu w języku angielskim w pracach pisanych w języku polskim). Tematyka dysertacji była już eksplorowana przez różne ośrodki badawcze, a peroksydaza chrzanowa jest często stosowana jako modelowy enzym w oznaczenia ilościowych określonych ligandów. Niemniej doktorat zawiera szereg analiz będących

podstawa do dalszego rozwoju syntezy materiałów imprintowanych dedykowanych do wspomagania reakcji katalitycznych.

Część wstępną rozpoczyna opis podstawowych wiadomości o reakcjach enzymatycznych, enzymach, roli jonów metali w przebiegu procesów biologicznych i właściwościach peroksydazy chrzanowej – obiektu badań Doktorantki. Mam zastrzeżenia do używania określenia „energy” dla funkcji G, ponieważ poprawnym terminem powinna być ‘free enthalpy’ entalpia swobodna lub potencjał termodynamiczny (dawniej). Niezręczny też wydaje się zapis reakcji na stronie 15, w którym zastosowano symbol ‘ \longleftrightarrow ’ zamiast standardowo stosowanego znaku równowagi reakcji. Następną Sekcja 5.2 zawiera zbiór informacji ogólnych o powstawaniu śladu molekularnego i wpływie na ten proces wielu czynników z uwzględnieniem możliwości tworzenia analogów metaloenzymów techniką imprintacji jako usieciowanych polimerów zawierających odpowiednio przestrzennie rozmieszczone wybrane grupy funkcyjne. Wstęp kończy przedstawienie możliwości imprintacji biomolekuł. W kolejnej części Doktorantka przedstawiła cel projektu (Sekcja 6), który według mnie powinien jednak zawierać informacje jakie problemy chciałaby rozwiązać i dlaczego są istotne. Ponadto Doktorantka powinna krótko uzasadnić, dlaczego wybrała określone substancje i metody. Dziwne wydaje się użycie terminu hydrożele w stosunku do badanych polimerów.

Następnie Doktorantka podaje szczegóły prac eksperymentalnych. W swojej recenzji ustosunkuję się kolejno do odrębnych badań składających się na pracę doktorską.

Otrzymywanie i analiza właściwości materiałów o potencjale metaloenzymów

Ciekawa problematyka, która już od pewnego czasu jest rozwijana w grupie wrocławskiej. Badania zaplanowane prawidłowo. Niemniej podczas oceny materiału napotkałam trudności w rozszyfrowaniu wielu istotnych szczegółów. Przepisy preparatywne są tak niedokładne, że trudno jest stwierdzić jakie typy układów były syntezowane. Użyte skróty na oznaczenie polimerów nie są podane w spisie skrótów. Proszę jeszcze raz przeczytać informacje na stronach 54 i 55, i sprawdzić czy łatwo można się zorientować w składzie faz i sposobie syntezy różnych typów polimerów powierzchniowych? Wyjaśnienie skrótu polimeru KP pojawia się na stronie 106 w podpisie pod rysunkiem, chociaż sam skrót pojawia się wcześniej i jest ważnym elementem dyskusji wyników. Czy łatwo można wydedukować jak otrzymywane były polimery CP1 i CP2 w świetle informacji na stronie 55, 90 i tytułach kolumn w Tabeli 15? Czy skróty KO - w/o lub KPS w/o lub KPS – SMn(II) (i analogiczne z Sekcji 9.4.1) nie powinny być dodatkowo objaśnione? Naprawdę trudno jest się zorientować jakie układy są badane!

Dużym walorem pracy jest próba określenia składu polimerów poprzez analizę obecności atomów azotu, ponieważ wielu badaczy zakłada a priori, że ilości poszczególnych substancji w produkcie odpowiadają składowi mieszaniny reakcyjnej. Natomiast problemem jest używanie określenia grupy aminowej wraz z symbolem NH_2 , ponieważ substraty nie zawierają grup aminowych, a atomy azotu występują w akrylonitrylu i 4-winylopirydynie. Doktorantka zauważyła, że ilość atomów azotu w polimerze jest niższa niż w mieszaninie przedreakcyjnej. Jako wyjaśnienie zaproponowała polimeryzację anionową akrylonitrylu i usunięcie jej produktu w trakcie przemywania ziaren polimeru. Nie sądzę, aby w przedstawionym procesie syntezy istniały warunki do polimeryzacji anionowej. Proszę o komentarz. W dyskusji wyników niektóre parametry są przedstawione dla wszystkich układów, a niektóre tylko dla wybranych, nawet wtedy, gdy pełne dane są istotne dla przebiegu dyskusji (Rysunki 27-32, Rysunki 35-42 itd). Czy wszystkie polimery i jony metali były analizowane jednakowo? Jeżeli nie, to dlaczego? Również widmo IR jest przedstawione tylko dla jednego układu. Może celowe byłoby zamieszczenie aneksu z pełną dokumentacją wyników pomiarów? Uważam też, że Doktorantka powinna podać odnośnik do własnej publikacji w Adv. in Mat. Sci. & Eng. ID 464265, 1-9 (2013) Hindawi PC, dotyczącej omawianych w dysertacji badań. Fragmenty dyskusji umieszczone są w niewłaściwych miejscach. Na przykład podsumowujący wniosek na stronie 109 powinien być podany na końcu rozważań o właściwościach katalitycznych stworzonych układów. Wnioski dotyczące jonów manganu nie są dobrze udokumentowane albo oznaczenia polimerów nad i pod Rysunkami 52 i 53 są mylące. Zaproponowany przebieg reakcji utleniania hydrochinonu (Rysunek 51) powinien być udokumentowany (widma NMR?). Chociaż hydroksylowanie 1,4-benzochinonu jest możliwe, należałoby potwierdzić czy rzeczywiście ma miejsce w badanym układzie. Dlaczego nie rozważano możliwości powstawania innych produktów pośrednich (pochodna monohydroksylowa, semibenzochinon)? Również informacja o dimerach, trimerach produktu i nakładających się pikach reagentów nie jest udokumentowana (widma UV-VIS, struktura produktów, piśmiennictwo), a ponieważ stanowi próbę wyjaśnienia nietypowych zmian stężeń podczas reakcji, jej brak utrudnia ocenę tej części dyskusji wyników. Wykresy na Rysunkach 58-60 i dalszych są opisane jako $L_{\text{H}_2\text{Q}} [\%]=f(t)$. Czy na pewno opis osi rzędnych jest prawidłowy? Czy terminy selektywność produktu (S_Q) i selektywność reakcji ($S_{\text{H}_2\text{Q}}$) są tożsame? (Niespójność z definicjami i oznaczeniami na stronach 64 i 65.) Wzór na wartość S_Q ($S_Q = C_{\text{BQ},t}/C_{\text{H}_2\text{Q},t}$) w mianowniku zawiera liczbę, której wartość dąży do zera, a więc w konsekwencji S_Q dąży do nieskończoności. Czy nie zaszła pomyłka we wzorze?

Podsumowując tą część dysertacji muszę podkreślić walory interesującej problematyki, całościowość zaplanowanych analiz i ciekawe wyniki, które jednak wymagają jeszcze dodatkowych badań w celu wyjaśnienia wartości wszystkich zmierzonych parametrów.

Bioimprintacja peroksydazy chrzanowej (HRP)

Ta część dysertacji prezentuje nowatorskie podejście do tworzenia miejsc wiążących w enzymach poprzez sieciowanie białek w obecności wzorca związanego ze szklanym podłożem. Jednym z potencjalnych zastosowań produktów bioimprintacji są testy typu ELISA umożliwiające oznaczanie wybranych analitów. Wzorcami są związki, które nie są substratami enzymu, a końcowy produkt nie traci właściwości enzymatycznych zyskując możliwość rozpoznania wzorca. Modelowym enzymem jest peroksydaza chrzanowa HRP zawierająca grupy aminowe lizyny, wzorcami wankomycyna i ampicylina, a czynnikiem sieciującym pentano-1,5-dial (aldehyd glutarowy). Sądzę, że Doktorantka powinna zamieścić odnośnik do opublikowanej własnej pracy (Nanoscale 8, 11060-11066, 2016), w której przedstawiono część wyników. W celu pracy Doktorantka podaje, że wzorcami były 3 cząsteczki wankomycyna, ampicylina i teikoplanina (strona 47), co nie jest zgodne z treścią pracy, ponieważ teikoplanina nie była imprintowana.

W całej pracy rozdziały są podzielone są na zbyt wiele podsekcji. Przykłady: 8.2 Crosslinking of HRP; 8.2.1 Crosslinking procedure; 8.2.2.3 Crosslinking procedure; 8.2.1.3.1 Optimisation of crosslinking method; 8.3.1.3.1.1 Calibration curve and washing step – temperature and pH changes; 8.2.4.1.1.4 Washing steps; itd). Tytuły podsekcji są mylące, a oznaczenia skrótów nazw polimerów nie są wyjaśnione przy pierwszym użyciu oraz są inne niż użyte w dyskusji wyników (choć można domyślić się ich znaczenia: #HRP, CL-HRP). Choć niewątpliwie ta część dokumentuje ogrom wykonanej pracy, czyta się ją trudno, ponieważ powody wyborów konkretnych działań (parametrów) i substancji nie zawsze są jasne. W podsekcji 8.2.1.3.1.2 Crosslinking reagent podana jest informacja o syntezie 2 typów polimerów usieciowanych: jednego z zastosowaniem aldehydu glutarowego, a drugiego z zastosowaniem epichlorohydryny. W dalszych częściach dysertacji nie pojawia się informacja o drugim polimerze. Niestety w części obejmującej wyniki i dyskusję ponownie pojawiają się szczegółowe opisy eksperymentów wraz z liniami kalibracyjnymi, tabelami. Choć dokumentują żmudną pracę laboratoryjną i potwierdzają konieczność optymalizacji każdego etapu procedur syntetycznych i analitycznych, nie ułatwiają recenzowania i stawiają pod znakiem zapytania przejrzystość wybranej konstrukcji pracy.

Kilka uwag krytycznych dotyczących niekonsekwencji opisów wyników i przedstawionych wykresów. W sekcji 9.2.2 na stronach 125-126 rozważany jest wpływ temperatury na aktywność imprintowanego HRP po 24 h, 7 i 14 dniach natomiast w tekst wpleciona jest informacja o aktywności po 48 i 72 h. W sekcji 9.2.3.4.1 również niejasny opis aktywności HRP z wolną i związaną z podłożem wankomycyną oraz nagle dołączoną informacją o działaniu ultradźwięków na biopolimer. Rysunki 87 i 88 również sprawiają problem w połączeniu z tekstem. Sądzę, że opis wszystkich wykonanych eksperymentów nie jest konieczny – można dokonać krytycznego wyboru i usystematyzować wyniki, a wtedy zyskują na przejrzystości i publikacje i doktoraty. Wyczerpujący opis opracowania procedury analitycznej i badania biopolimeru dotyczy biopolimeru sieciowanego w obecności wankomycyny. Natomiast brak jest informacji czy wszystkie badania powtórzono dla polimeru imprintowanego amplicyliną? A może wszystkie procedury zoptymalizowane dla jednego analitu przeprowadzono dla innych już bez zmian? Mam wrażenie, że większość badań wykonano dla HRP usieciowanego w obecności wankomycyny, natomiast pomijanie tego w tytułach sekcji i w tekście jest nieprawidłowe w świetle informacji w abstrakcie i celu pracy, które mogą sugerować, że pełne badania wykonano dla obu biopolimerów. Dyskusja w sekcji 9.2.3.4.3 nie jest jasna do końca, ale jasne jest, że usieciowanie HRP w obecności różnych molekuł wzorcowych prowadzi do biopolimerów o większej aktywności wobec tych molekuł. Czy legenda do Rysunku 95 jest prawidłowa? Niestaranność opracowania legend do wielu rysunków, a następnie używanie innych terminów w dyskusji sprawia duże trudności w śledzeniu dyskusji.

Cennym elementem pracy są badania struktury warstw na mikroplątkach, na podłożu stałym i nanocząsteczek polimerowych. Zamieszczenie Rysunków 97, 98 oraz 104 i 105 nie wydaje się celowe, a liczbowe dane z nich wynikające już są podane w tabelach. Błąd edytorski na stronie 155 zniekształca poprawność rozumowania dotyczącego wpływu ultradźwięków na agregację nanocząsteczek. Niestety praca doktorska zawiera wiele błędów edytorskich: brak odwołań do wszystkich zamieszczonych rysunków, wolne miejsca, inne skróty użyte w tekście i tabelach, które utrudniają śledzenie drogi rozumowania i powodów podejmowania decyzji badawczych. Do podsekcji 9.2.7 (na stronie 164) opracowującej dane termodynamiczne, wkradły się nieścisłości. Sądzę, że właściwiej byłoby operować terminem równanie (izobara) van't Hoffa, które pozwala wyznaczyć stałą równowagi reakcji w danej temperaturze, jeżeli znamy stałą równowagi w innej (przy założeniu stałości entalpii reakcji w tym zakresie temperatury). A może jednak należało rozważyć izotermę van't Hoffa, która wiąże entalpię swobodną ΔG ze stałą równowagi reakcji w danej temperaturze? Wtedy

pominięcie wpływu entropii (i wykorzystanie tylko zmian entalpii) dobrze tłumaczyłoby różnice eksperymentalne.

Podsumowując, ta część pracy udowadnia ogromny potencjał techniki imprintacji, która może rozwiązać wiele problemów analizy medycznej. Jednocześnie pokazuje jak wiele czynników musi być wzięte pod uwagę, aby sprostać oznaczeniom użytecznym terapeutycznie.


Nanocząsteczki polimeru imprintowanego peroksydazą chrzanową

Ta część pracy jest potraktowana bardzo skrótowo, chociaż pokazuje bardzo interesujące zastosowanie polimerów imprintowanych jako chaperonów – ‘białek opiekuńczych’, które utrwalają właściwe fałdowanie białek umożliwiając im zachowanie aktywności enzymatycznej. Zbadano rozmiary i agregację cząsteczek polimerowych oraz sprawdzono czy nanocząsteczki mogą stabilizować aktywność HRP podczas testów z wykorzystaniem substratu 3,3',5,5'- tetrametylobenzydyny. Porównano aktywność HRP w różnej temperaturze i przy różnym stężeniu nanocząstek. Szkoda, że nie zinterpretowano spadku aktywności HRP przy najwyższym stężeniu nanocząstek.

Podsumowując, ta część jest ‘rozpoznaniem bojem’ nowej tematyki, a otrzymane wyniki są bardzo obiecujące.

Wnioski końcowe

Ze względu na istotność otrzymanych wyników: opracowanie materiałów drukowanych molekularnie opartych na biopolimerach i symulujących działanie biokatalizatorów, badanie ich struktury i właściwości oraz szczegółowe zoptymalizowanie procedur analitycznych uważam, że przedstawiona dysertacja jest opracowaniem oryginalnym i spełnia wymagania Art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i przedkładam Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Czulak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Organicznej

Prof. dr hab. Dorota Maciejewska