



Wrocław, 21-09-2026

RECENZJA**rozprawy doktorskiej mgr Oli Grabowskiej pt. „Termodynamiczne i strukturalne aspekty oddziaływań związków małowcząsteczkowych z albuminą i lizozymem”**

Badania będące podstawą przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej zostały wykonane przez Doktorantkę w Zakładzie Chemii Fizycznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Dariusza Wyrzykowskiego. Tematyka rozprawy koncentruje się na termodynamicznych, strukturalnych i molekularnych aspektach oddziaływań małowcząsteczkowych ligandów z białkami globularnymi, przede wszystkim albuminami i lizozymem, oraz wykorzystaniu tych oddziaływań do wyjaśnienia procesów rozpoznawania molekularnego, stabilizacji białek oraz formowania kompleksów supramolekularnych. Szczególne miejsce w przedstawionym dorobku zajmuje izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC), która stanowi centralne narzędzie ilościowego opisu badanych procesów. Poruszana w pracy problematyka oddziaływań białko-ligand należy do bardzo istotnych zagadnień współczesnej chemii biologicznej, biofizyki czy chemii farmaceutycznej. Poznanie i zrozumienie czynników odpowiedzialnych za odpowiednie powinowactwo ligandów do białek, mechanizmów stabilizacji struktur białkowych czy też roli środowiska molekularnego w procesach rozpoznawania białko-ligand, czy białko-białko pozostaje jednym z najważniejszych wyzwań dzisiejszej chemii biologicznej i medycznej. W tym kontekście rozprawa mgr Oli Grabowskiej wpisuje się bardzo dobrze w aktualny nurt badań nad zależnością pomiędzy strukturą chemiczną małych cząsteczek a ich właściwościami biologicznymi.

Przedstawiona rozprawa została przygotowana w formie przewodnika obejmującego aż dziesięć publikacji naukowych powiązanych tematycznie. Konstrukcja pracy jest spójna i niezwykle logiczna. Poszczególne publikacje nie stanowią przypadkowego zbioru artykułów, lecz stanowią konsekwentnie rozwijany problem badawczy. Szczególnie wysoko oceniam fakt, że kolejne prace budują coraz bardziej złożony obraz oddziaływań surfaktantów, anionów nieorganicznych oraz związków supramolekularnych z makrocząsteczkami.

W przeciwieństwie do wielu rozpraw opartych na publikacjach, w ocenianej pracy widoczna jest wyraźna ciągłość tematyczna prowadzonych badań. W pracy uwagę zwraca szeroki wachlarz stosowanych metod badawczych. Najistotniejszą z nich jest tu, wspomniana wcześniej, kalorymetria ITC, która jest kluczową metodę w badaniach energetyki oddziaływań międzycząsteczkowych. Z własnego doświadczenia wiem, że jest to metoda trudna w analizie, gdyż na energetykę ma wpływ ogrom procesów i reakcji, które należy wziąć pod uwagę by poznać interesujące nas parametry termodynamiczne związane z samym oddziaływaniem międzycząsteczkowym. Oprócz ITC, Doktorantka wykorzystała w swojej pracy spektroskopię fluorescencyjną, dichroizm kołowy (CD), różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), pomiary konduktometryczne, elektrochemię oraz zaawansowane symulacje dynamiki molekularnej. Szczególnie cenne jest to, że metody wzajemnie się uzupełniają i dają pełny obraz opisywanych oddziaływań. Dzięki temu Autorka nie ogranicza się do wyznaczania parametrów związanych z wiązaniem, ale podejmuje próbę ich interpretacji na poziomie molekularnym.

Rozprawa liczy ponad 100 stron i ma charakter klasycznej pracy doktorskiej opartej na cyklu publikacji. Zawiera ona wprowadzenie teoretyczne, cel i zadania badawcze, opis metod, obszerną dyskusję wyników oraz podsumowanie, a także perspektywy dalszych badań. Wprowadzenie do pracy jest bardzo obszerne i należy do najmocniejszych elementów rozprawy. Autorka w sposób uporządkowany przedstawia zarówno charakterystykę albumin, jak i lizozymu, podkreślając różnice w ich strukturze, ładunku oraz funkcji biologicznej, co uzasadnia ich wybór jako układów modelowych. Na szczególne uznanie zasługuje zestawienie właściwości miejsc wiążących albuminy (Sudlow I i II) oraz kontrastowe

ujęcie lizozymu jako modelu dominujących oddziaływań elektrostatycznych. Mimo walorów merytorycznych, wprowadzenie jest bardzo rozbudowane i momentami traci charakter syntetycznego przeglądu, przechodząc w szczegółowy opis o charakterze bardziej podręcznikowym. We wprowadzeniu zabrakło wyraźnego podkreślenia luki badawczej, którą Autorka zamierza wypełnić realizując projekt doktorski. Cel pracy wynika raczej z ogólnego stanu wiedzy niż z wyraźnie wskazanego problemu.

Cel pracy został sformułowany jasno i obejmuje określenie zależności pomiędzy właściwościami wybranych ligandów a mechanizmem ich oddziaływań z albuminą i lizozymem. Zadania badawcze są logiczne oraz dobrze zaplanowane i obejmują zarówno analizę termodynamiczną, lokalizację miejsc wiązania jak i wpływ parametrów środowiskowych. Rozdział metodologiczny prezentuje bardzo szeroki zestaw technik eksperymentalnych, poczynwszy od ITC, przez spektroskopię, po metody elektrochemiczne i modelowanie molekularne. Zastosowanie ITC jako metody wiodącej jest w pełni uzasadnione i stanowi jedną z najmocniejszych stron pracy. Tu mam jednak dwa pytania. Jakie są główne źródła błędów w analizie ITC w badanych układach i jak zostały skorygowane? Czy przeprowadzono walidację modeli względem danych eksperymentalnych, np. poprzez symulację krzywych ITC lub parametrów termodynamicznych?

Dyskusja wyników to najważniejsza i najbardziej rozbudowana część pracy. Autorka w sposób przekonujący pokazuje, że mechanizm wiązania ligandów nie jest determinowany pojedynczym parametrem, lecz wynika z synergii czynników takich jak rozmiar, ładunek oraz charakter hydrofilowo-hydrofobowy. Szczególnie wartościowe są analizy porównawcze różnych klas ligandów oraz konkurencyjne eksperymenty modelujące rzeczywiste układy biologiczne. Na uznanie zasługuje również konsekwentne powiązanie wyników eksperymentalnych z analizą termodynamiczną, zwłaszcza rozróżnienie procesów sterowanych entalpowo i entropowo oraz ich interpretacja w kontekście oddziaływań molekularnych. Tego typu podejście świadczy o bardzo dobrej orientacji Autorki w nowoczesnej chemii fizycznej układów biologicznych

Pierwsza część dyskusji to analiza oddziaływań SDS z albuminą, która została przeprowadzona bardzo szczegółowo, z wykorzystaniem ITC, metod spektroskopowych i modelowania. Na szczególne wyróżnienie zasługuje rozróżnienie miejsc wiązania, analiza wpływu pH i temperatury, identyfikacja trzeciego miejsca wiążącego w określonych warunkach. Jednakże, interpretacja pojawienia się trzeciego miejsca wiązania mogłaby zostać bardziej jednoznacznie powiązana z modelowaniem. Brak jest tu dyskusji alternatywnych modeli wiązania, np. modeli kooperatywnych czy niezależnych. Interpretacja pojawienia się trzeciego miejsca nie jest jednoznaczna i może równie dobrze wynikać z efektów kooperatywnych, agregacji SDS czy zmian konformacyjnych białka. Na ile można wykluczyć udział agregatów SDS w interpretacji wyników?

W kolejnej części Autorka prezentuje różnice pomiędzy mechanizmami wiązania ligandów hydrofobowych i amfifilowych. Szczególnie wartościowe jest porównanie sterowania entalpowego i entropowego. Doktorantka słusznie wskazuje na podobną wartość ΔG dla różnych ligandów, jednak nie rozwija głębiej konsekwencji tego faktu, np. dla projektowania leków. Czy można oszacować wkład hydratacji i reorganizacji rozpuszczalnika w obserwowanym efekcie entropowym? Jedyne krytyczne komentarze do tej części pracy związane są z uproszczonym modelem biologicznym (komórki PC3). Brak jest odniesienia do bardziej złożonych układów biologicznych. Interpretacja wyników cytotoksyczności jest poprawna, ale mogłaby być bardziej pogłębiona mechanistycznie.

W kolejnych częściach rozprawy szczególnie interesujący jest opis tworzenia kompleksów z β cyklodekstryną, analiza procesów agregacji czy wpływ ligandów na stabilność białek. W tej części pojawia się największe rozproszenie tematyczne. Brak jest jednej, syntetycznej koncepcji łączącej wszystkie wyniki. Rola modelowania molekularnego jest tu mniej wyraźna niż we wcześniejszych rozdziałach. Czy Autorka można przedstawić uniwersalny model oddziaływania cyklodekstryny z badanymi ligandami? Jak wygląda kinetyka procesu „wyłapywania” liganda przez cyklodekstrynę?

Ostatnia część dyskusji dotyczy oddziaływania jonów heksacyjanożelazianowych(II)/(III) z albuminami i lizozymem. Pracę wieńczy Podsumowanie i Perspektywa dalszych badań. Są to rozdziały

opracowane bardzo syntetycznie i logicznie. Da się jednak odczuć pewną zachowawczość Autorki. Bibliografia to 106 pozycji, które zostały wybrane bardzo trafnie i odnoszą się zarówno do części teoretycznej, metodologicznej i dyskusji wyników.

Należy wspomnieć, że Doktorantka kopie swoich artykułów umieściła w Aneksie, który fizycznie stanowi ponad połowę pracy doktorskiej. To, czego mi zabrakło, to krótki wstęp do każdej z prac. Nie jest to konieczne, gdyż wyniki zostały wcześniej już opisane, ale wprowadzenie czy krótkie wyjaśnienie powodów działań ułatwiłoby lekturę wspomnianych artykułów. Poniżej przedstawiam kilka pytań i komentarzy, które pojawiły się w trakcie owej lektury:

- Na ile zastosowany model dwóch miejsc wiążących jest modelem jednoznacznym? Czy analizowano możliwość istnienia większej liczby stanów pośrednich, szczególnie w układzie $\text{pH} = 5$ i 288 K , gdzie pojawiają się przesłanki wskazujące na trzeci efekt energetyczny w przebiegu miareczkowania? (Publikacja 1)

- Czy możliwe byłoby zweryfikowanie proponowanych miejsc wiążących innymi metodami strukturalnymi, na przykład przez NMR lub krystalografię, gdyby takie dane były dostępne (Publikacja 2)?

- W wielu pracach interpretacja rodzaju sił odpowiedzialnych za wiązanie opiera się przede wszystkim na wzajemnych relacjach między ΔH oraz $T\Delta S$. Choć jest to podejście szeroko stosowane, należy pamiętać, że złożoność procesów hydratacyjnych powoduje, iż przypisywanie określonych typów oddziaływań wyłącznie na podstawie kompensacji entalpia-entropia powinno być traktowane ostrożnie. Czy obserwowaną kompensację entalpia-entropia można uznać za cechę uniwersalną badanych procesów, czy raczej za efekt specyficznych warunków eksperymentalnych?

- Który z analizowanych układów uważa Doktorantka za najbardziej reprezentatywny dla rzeczywistych procesów zachodzących *in vivo*?

- Które z przedstawionych wyników mają największy potencjał aplikacyjny w projektowaniu nowych ligandów?

Podsumowując, Praca mgr Oli Grabowskiej jest bardzo rozbudowanym i dobrze wykonanym studium oddziaływań ligand-białko. Jej największą zaletą jest szeroki zakres metod oraz konsekwencja w analizie termodynamicznej. Pomimo powyższych uwag, które mają charakter głównie dyskusyjny, należy jednoznacznie stwierdzić, że przedstawiona rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego planowania i realizacji badań, krytycznej analizy danych oraz formułowania wniosków o charakterze ogólnym. Praca wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat oddziaływań ligand-białko, szczególnie w ujęciu termodynamicznym i strukturalnym, a uzyskane wyniki mają potencjał zarówno poznawczy, jak i aplikacyjny. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Oli Grabowskiej w pełni spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), przepisy wprowadzające ustawę o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.). Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Oli Grabowskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki przedstawione w rozprawie zostały opublikowane w cyklu aż 10 publikacji (Doktorantka jest również współautorką czterech artykułów niepowiązanych z tematyką rozprawy) powiązanych ze sobą tematycznie w renomowanych czasopismach naukowych, Kandydatka przygotowała bardzo dobrą rozprawę i przeprowadziła dojrzałą dyskusję, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne U. G. o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Oli Grabowskiej.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

