

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Oli Grabowskiej pt. „Termodynamiczne i strukturalne aspekty oddziaływań związków małocząsteczkowych z albuminą i lizozymem” wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr. hab. Dariusza Wyrzykowskiego, prof. UG.

Powierzona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Oli Grabowskiej została wykonana w Katedrze Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Profesora Dariusza Wyrzykowskiego. Na wstępie pragnę podkreślić, że od pierwszych stron dysertacji uwagę zwraca starannie przemyślany program badawczy oraz atrakcyjna i aktualna tematyka. Nie jest to zaskoczeniem, zważywszy, że Promotor jest uznanym specjalistą w obszarze podejmowanej problematyki. Rozprawa jest rezultatem konsekwentnie rozwijanego programu badawczego, mieszczącego się na pograniczu chemii biologicznej, fizycznej i supramolekularnej ze szczególnym uwzględnieniem termodynamicznych oraz strukturalnych aspektów oddziaływań związków małocząsteczkowych z biomolekułami. Dobór problemów i zwiększanie ich złożoności świadczą o wysokiej kulturze prowadzenia badań oraz stworzeniu Doktorantce warunków sprzyjających samodzielności naukowej.

Tematyka rozprawy dotyczy oddziaływań związków małocząsteczkowych z białkami, a więc zagadnienia fundamentalnego dla zrozumienia procesów biologicznych. Sposób i siła wiązania liganda wpływają na jego dostępność, transport, trwałość, aktywność i potencjalną toksyczność. Problem ma zatem znaczenie poznawcze i praktyczne dla chemii bioorganicznej, farmacji i biotechnologii. Za szczególnie trafne uważam porównanie ligandów różniących się rozmiarem, ładunkiem i równowagą hydrofilowo-hydrofobową, co pozwoliło sformułować zależności wykraczające poza opis pojedynczych układów.

Praca stanowi spójne opracowanie wyników będących podstawą dziesięciu powiązanych tematycznie publikacji naukowych, opublikowanych w renomowanych czasopiśmie międzynarodowych o wysokim współczynniku oddziaływania. Obejmuje wprowadzenie, cel i zadania badawcze, materiały i metody, dyskusję wyników, podsumowanie oraz perspektywy dalszych badań, a uzupełniają ją załączone artykuły. Układ rozprawy jest logiczny i pozwala prześledzić rozwój koncepcji: od modelowych oddziaływań surfaktantów z albuminą, przez wpływ budowy ligandów i procesów konkurencyjnych, po porównanie albumin z lizozymem oraz zastosowanie cyklodekstryny do kontrolowania zmian struktury białka.

Celem rozprawy było określenie cech strukturalnych i fizykochemicznych ligandów decydujących o sile, mechanizmie i lokalizacji ich wiązania z białkami. Jako układy modelowe wybrano albuminy surowicy bydlęcej i ludzkiej oraz lizozym. Wybór ten oceniam jako bardzo przemyślany: albuminy są elastycznymi białkami transportowymi z wyspecjalizowanymi wnękami, natomiast lizozym jest białkiem bardziej zwartym, o odmiennym ładunku i funkcji. Badaniami objęto 1-alkilosiarczany i 1-alkilosulfoniany, jon tetrafenyloboranowy, polioksowanadany oraz jony heksacyjanożelazianowe(II) i (III), a także beta-cyklodekstrynę.

Na bardzo wysoką ocenę zasługuje warsztat metodyczny. Główną techniką była izotermiczna kalorymetria miareczkowa, umożliwiająca wyznaczenie stałych wiązania, stechiometrii i parametrów termodynamicznych. Wyniki zestawiono z danymi miareczkowania konduktometrycznego, spektroskopii fluorescencyjnej, dichroizmu kołowego, skaningowej kalorymetrii różnicowej, technik elektrochemicznych i testów aktywności biologicznej, a interpretację pogłębiono za pomocą symulacji dynamiki molekularnej. Takie połączenie metod pozwoliło powiązać termodynamikę z lokalizacją ligandów, zmianami konformacji białka i konsekwencjami funkcjonalnymi.

W badaniach dodecylosiarczanu sodu z albuminą surowicy bydlęcej wykazano obecność co najmniej dwóch miejsc wiązania monomerów SDS. Pierwsze, zlokalizowane w pobliżu Trp-134, charakteryzuje się wysokim powinowactwem, drugie natomiast ma mniejsze powinowactwo i silniej zależy od warunków eksperymentalnych. Nasycenie pierwszego miejsca przy niewielkiej ilości surfaktantu zwiększa stabilność termiczną helikalnej struktury BSA. Pokazuje to, że efekt zależy od stężenia i lokalizacji liganda i nie musi prowadzić do destabilizacji białka.

Dla jonu tetrafenyloboranowego, będącego modelem dużego hydrofobowego anionu, wykazano dwa główne miejsca wiązania z BSA: w pobliżu Trp-134 oraz w subdomenie IIIA. Porównanie z SDS dowiodło, że podobne wartości powinowactwa nie oznaczają identycznego sposobu wiązania. Doświadczenia konkurencyjne pokazały ponadto, że zajęcie wspólnego miejsca przez jeden ligand wpływa na stechiometrię wiązania drugiego. Kompleksowanie tetrafenyloboranu nie naruszało struktury drugorzędowej albuminy, lecz zwiększało jej odporność termiczną.

Istotnym osiągnięciem jest analiza konkurencyjnych oddziaływań polioksowanadanów i jonów dodecylosiarczanowych z BSA. Autorka wykazała, że albumina obecna w standardowych pożywkach hodowlanych może wiązać badaną substancję i zmieniać stężenie jej wolnej, biologicznie aktywnej frakcji. Ma to bezpośrednie znaczenie dla interpretacji testów cytotoksyczności i zależności stężenie-efekt, a zarazem wskazuje na potrzebę świadomego uwzględniania konkurencji o miejsca wiązania podczas projektowania eksperymentów biologicznych.

Bardzo interesująca jest porównawcza analiza 1-alkilosiarczanów i 1-alkilosulfonianów. Pozornie niewielka zmiana grupy hydrofilowej i rozkładu ładunku wpływała na liczbę miejsc wiązania, stechiometrię i stabilność kompleksów z albuminami; znaczenie miała również długość łańcucha węglowodorowego. Prowadzi to do kluczowego wniosku, że mechanizmu wiązania nie można przewidywać na podstawie pojedynczej cechy liganda. O zachowaniu układu decyduje współdziałanie rozmiaru, ładunku i charakteru hydrofilowo-hydrofobowego, modulowane przez architekturę białka i warunki środowiska.

Za szczególnie wartościowy uważam cykl badań kompleksów inkluzyjnych surfaktantów z beta-cyklodekstryną i ochrony struktury lizozymu. Wykazano, że 1-alkilosulfoniany, zwłaszcza o dłuższym łańcuchu, mogą zaburzać strukturę drugorzędową białka. Beta-cyklodekstryna, wykazująca większe powinowactwo do hydrofobowego fragmentu surfaktantu, przechwytuje go i umożliwia odwrócenie zmian konformacyjnych oraz ponowne zwinięcie lizozymu. Jest to elegancki przykład kontrolowania równowag supramolekularnych za pomocą liganda konkurencyjnego, istotny także dla projektowania formulacji.

Badania jonów heksacyjanożelazianowych(II) i (III) z albuminami i lizozymem pozwoliły ocenić znaczenie ładunku elektrostatycznego. Silniej naładowany jon heksacyjanożelazianowy(II) wykazywał większe powinowactwo do dodatnio naładowanego lizozymu niż analogiczny jon na III stopniu utlenienia. Wiązanie miało głównie charakter entalpowy i powierzchniowy, nie powodowało jednak istotnej destabilizacji struktury ani zahamowania aktywności enzymatycznej. Wynik ten dowodzi, że sama siła oddziaływania nie przesądza o zmianie funkcji białka; ważne są także lokalizacja liganda i dostęp do centrum aktywnego.

Największą wartością poznawczą rozprawy jest wyprowadzenie na podstawie przeprowadzonych badań ogólnych prawidłowości opisujących oddziaływania ligand-białko. Ligandy hydrofobowe preferują odpowiednie kieszenie, aniony regiony wzbogacone w dodatnio naładowane reszty, a związki amfifilowe wykorzystują oba rodzaje oddziaływań. W albuminach istotną rolę odgrywa plastyczność domen i adaptacja do budowy liganda, natomiast w lizozymie większe znaczenie mają oddziaływania powierzchniowe. Cenne jest również wskazanie granic uogólnień: nawet homologiczne BSA i HSA mogą różnić się specyficznością, a stałe równowagi należy porównywać w zgodnych warunkach.

Rozprawa została napisana starannie, poprawnym i precyzyjnym językiem naukowym. Zestawienia tabelaryczne ułatwiają porównanie właściwości białek, ligandów i parametrów oddziaływań. Dyskusja nie ogranicza się do streszczenia publikacji, lecz porządkuje wyniki według wspólnej koncepcji i prowadzi do wniosków przekraczających zakres pojedynczych artykułów. Na uznanie zasługuje także wskazanie dalszych kierunków badań, w tym analizy kinetyki i walidacji miejsc wiązania. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Nie stwierdzam w rozprawie uchybień uzasadniających formułowanie uwag krytycznych. Poniższe dwa pytania wynikają wyłącznie z zainteresowania inspirującą tematyką pracy i mogą stanowić punkt wyjścia do dyskusji podczas publicznej obrony:

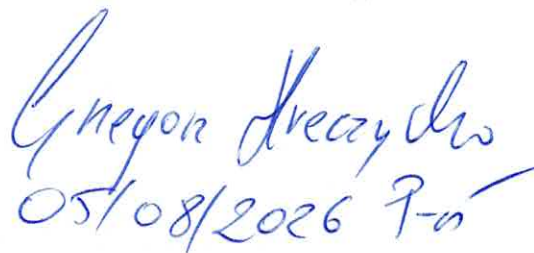
1. Jednym z aktualnych problemów środowiskowych i biomedycznych jest tworzenie tzw. korony białkowej na powierzchni mikro- i nanoplastików. Czy podejście łączące izotermiczną kalorymetrię miareczkową, metody spektroskopowe i modelowanie molekularne można zaadaptować do badania oddziaływań albuminy lub lizozymu z takimi cząstkami? Które elementy metodyki wymagałyby największych zmian ze względu na polidispersyjność i heterogeniczność powierzchni mikroplastiku?

2. W rozprawie wykazano, że o sposobie wiązania decyduje współdziałanie rozmiaru, ładunku oraz charakteru hydrofilowo-hydrofobowego liganda. Który z tych parametrów Doktorantka uznałaby za najbardziej użyteczny punkt wyjścia do przewidywania zachowania nowego liganda i w jakich sytuacjach przedstawione zależności przestają mieć charakter uniwersalny?

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Oli Grabowskiej stanowi oryginalne i dojrzałe rozwiązanie istotnego problemu naukowego. Dokumentuje szeroką wiedzę teoretyczną Autorki, bardzo dobre opanowanie różnorodnych metod, umiejętność integrowania wyników eksperymentalnych i obliczeniowych oraz zdolność do samodzielnego formułowania wniosków. Badania wnoszą istotny wkład w poznanie zależności pomiędzy budową ligandów a mechanizmem ich oddziaływania z białkami, a ich wartość obejmuje również praktyczne wskazówki dotyczące interpretacji testów biologicznych, projektowania formulacji i kontrolowania zmian struktury białek.

Gratuluje Pani mgr Oli Grabowskiej przygotowania znakomitej rozprawy doktorskiej oraz życzę dalszych sukcesów (miejmy nadzieję) w karierze naukowej. Gratulacje kieruję również do Promotora, Profesora Dariusza Wyrzykowskiego, za doskonałe pokierowanie realizacją doktoratu i rozwojem naukowym Doktorantki.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Oli Grabowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne. Jednocześnie, ze względu na ponadprzeciętny poziom naukowy, spójność i interdyscyplinarny charakter rozprawy, składam osobny wniosek o jej wyróżnienie.



Grzegorz Hreczycho
05/08/2026 P-o

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR OLI GRABOWSKIEJ

Zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Oli Grabowskiej pt. „Termodynamiczne i strukturalne aspekty oddziaływań związków małowcząsteczkowych z albuminą i lizozymem”, wykonanej pod kierunkiem Profesora Dariusza Wyrzykowskiego.

Podstawą wniosku jest wysoki poziom naukowy rozprawy, jej oryginalność oraz szeroki i interdyscyplinarny zakres przeprowadzonych badań. Doktorantka w sposób dojrzały połączyła wyniki uzyskane z wykorzystaniem wielu komplementarnych metod, tworząc spójny obraz analizowanych zjawisk. Na szczególne uznanie zasługują umiejętność krytycznej interpretacji wyników, trafność formułowanych wniosków oraz wysoki stopień samodzielności naukowej.

Rozprawa, oparta na dziesięciu tematycznie powiązanych publikacjach, stanowi wartościowy i znaczący wkład w rozwój badanej problematyki. Jej poziom wyraźnie przewyższa wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego z pełnym przekonaniem wnioskuję o jej wyróżnienie.

Grzegorz Hreczycho
05/08/2026 P-n