



## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

pt. "Bionanokompleksy nanocząstek złota z enzymami – zastosowanie w biosensorach"

autorstwa Pani mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. "Bionanokompleksy nanocząstek złota z enzymami – zastosowanie w biosensorach" wykonana została przez Panią mgr Renatę Wojnarowską-Nowak w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. Eugeniusza Szeregija.

Na przestrzeni ostatnich dwóch dekad nastąpił gwałtowny rozwój nanotechnologii a w tym zastosowania nanocząstek w wielu dziedzinach nauki. Coraz częściej prowadzone są prace z wykorzystaniem nanocząstek w szeroko pojętej medycynie. Prowadzi się prace nad zastosowaniem różnego typu nanocząstek jako biosensorów, markerów transportu leków czy czynników wzmacniających różnego rodzaju terapie. Z uwagi na ich różnorodne właściwości do ich śledzenia wykorzystuje się zarówno promieniowanie rentgenowskie jak i techniki spektroskopii oscylacyjnej czy pole magnetyczne. Tak więc, wykorzystanie nanocząstek i nowoczesnych technik analitycznych należy do ważnych obszarów badań fazy skondensowanej, biomateriałów a nawet diagnostyki i terapii medycznej. Stąd też badania interdyscyplinarne odgrywają ważną rolę zarówno w zakresie badań podstawowych jak i aplikacyjnych prowadząc do stałego rozwoju technologicznego, a stosowane techniki spektroskopii oscylacyjnej pozwalają na uzyskanie bogatej informacji o własnościach materii i występujących oddziaływaniach.

Starając się sprostać wyzwaniom zapotrzebowania na badania analityczne z zakresu wykrywania niskich stężeń molekuł czy diagnostyki na wczesnym etapie występowania zjawisk patologicznych występujących w organizmach żywych, mgr Renata Wojnarowska-Nowak postanowiła opracować technologię



wytwarzania bionanokompleksów nanocząstek złota z enzymem oksydazy cholesterolowej. Znając zjawiska zachodzące w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z metalami, doktorantka postanowiła wykorzystać je w swoich badaniach dzięki wywołaniu efektu powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego. Tak zwana technika SERS charakteryzuje się bardzo dużą czułością pozwalającą na badanie nawet pojedynczych cząsteczek. W zaproponowanych badaniach pani Wojnarowska-Nowak wykorzystywała też spektroskopię w podczerwieni, która jest techniką komplementarną do rozproszenia Ramana.

Recenzowana rozprawa została opisana na 129 stronach maszynopisu, posiada streszczenie, 6 rozdziałów merytorycznych, wnioski końcowe, spis rysunków, spis tabel, bibliografię zawierającą 146 pozycji oraz wykaz dorobku autorki. Tekst ilustrowany jest kolorowymi rysunkami, wykresami oraz tabelami. Na początku rozprawy autorka zamieściła przydatny dla czytelnika wykazu skrótów i nazw używanych w tekście.

Niestety, rozprawa nie zawiera streszczenia w języku angielskim jak zaleca zapis pkt. 6 w Art. 13 Ustawy z dn. 14.03.2013 r. (DU 2017 poz. 1789 tekst jednolity). W rozprawie nie określono również tezy a ograniczono się jedynie do podania celów w opisie problemu badawczego. Mam jednak nadzieję, że **podczas obrony doktorantka przedstawi tezę skoro ma jej bronić oraz dołączy abstrakt w języku angielskim.**

Pierwszy rozdział rozprawy – *Wprowadzenie* – zawiera podstawowe informacje dotyczące powierzchniowo wzmocnionego rozpraszania ramanowskiego (SERS) wprowadzając czytelnika w tajniki podstaw fizycznych stosowanej metody. W rozdziale tym autorka zaznajamia czytelnika z pojęciem bionanokompleksów, wyjaśniając oddziaływanie nanocząstek z biologicznie aktywnymi związkami – enzymami – podając właściwości kompleksów nanocząstka – enzym oraz ich zastosowanie. Rozdział kończy opis bionanosensorów opartych na nanocząstkach. W opisie tym, autorka w bardzo przejrzysty sposób uzasadnia wybór techniki badawczej.

Drugi rozdział – *Problem badawczy* – poświęcony jest uzasadnieniu wyboru badań jednego z ważnych enzymów jakim jest oksydaza cholesterolowa (ChOX).



Trzeci rozdział – *Technologia wytwarzania bionanokompleksów i opis metod ich charakterystyki* – jest to najistotniejszy rozdział w rozprawie. Z rozdziału tego czytelnik dowiaduje się w jaki sposób dokonać syntezy nanocząstek. Autorka opisuje tu dwie metody: pierwszą jest zmodyfikowana metoda Turkevicha a druga to metoda wykorzystująca borowodorek sodu i bromek cetylotrimetyloaminowy. Podany jest również proces biofunkcjonalizacji nanocząstek i immobilizacji oksydazy cholesterolowej na powierzchni nanocząstek złota. Do tego celu doktorantka wykorzystwała trzy linkery MHDA, MPA i CYS. Ten pierwszy składa się z długiego łańcucha węglowego a te dwa ostatnie z bardzo krótkich łańcuchów węglowych. Oprócz protokołów otrzymania kompleksów, autorka dokonuje opisu metod wykorzystanych do charakterystyki wytworzonych bionanokompleksów. Metodami tymi były: mikroskopia sił atomowych, metody biochemiczne, spektroskopia UV-VIS, spektroskopia w zakresie podczerwieni oraz spektroskopia ramanowska.

Kolejne istotne rozdziały rozprawy, stanowiące jej najważniejszą część, a zarazem najobszerniejsze, to rozdziały czwarty, piąty i szósty prezentujące wyniki i ich analizę.

Rozdział czwarty – *Właściwości strukturalne i biochemiczne bionanokompleksów AuNP-ChOX* – prezentuje wyniki badań w zakresie określenia otrzymanych rozmiarów nanocząstek, do czego wykorzystano technikę AFM oraz UV-VIS. W rozdziale tym zaprezentowano również symulacje bliskiego pola wokół nanocząstek złota. Symulacje zwizualizowano na załączonym rysunku, wyjaśniając przy tym mechanizm oddziaływania i uzasadniając wybór lasera o odpowiedniej długości fali (633 nm) do prowadzenia analiz.

Rozdział piąty – *Analiza widm FTIR bionanokompleksu* – należy do dwóch najistotniejszych rozdziałów rozprawy, albowiem zawiera wyniki analiz przeprowadzonych na poszczególnych etapach procesu wytwarzania kompleksów. Autorka zwraca uwagę na odpowiednie przypisanie pasm, ich przesunięcia i strukturę dla poszczególnych próbek (z linkerami MHDA, MPA i CYS). Określa położenia pasm w widmach IR dla ChOX w różnych środowiskach: powietrzu, buforze i dla bionanokompleksu. Ponadto określona została również struktura drugorzędowa oksydazy cholesterolowej na bazie



rozkładu pasm amidowych. Dzięki analizie struktury drugorzędowej badanych związków, doktorantka wyznaczyła skład procentowy udziałów poszczególnych struktur ( $\beta$ -kartek,  $\alpha$ -helis i innych).

Rozdział szósty – *Efekt SERS bionanokompleksów AuNP-ChOX* – dotyczy analiz wykonanych techniką rozpraszania ramanowskiego. Zastosowana technika pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji o badanych związkach w stosunku do techniki FTIR. W rozdziale tym, Autorka pokazała wykorzystanie laserów o różnych długościach fal, zależność intensywności sygnału ramanowskiego od rozmiarów nanocząstek, oraz wskazała na pasma, które mogą służyć jako markery w analizach. Wykonanie tych porównań pozwoliło na wskazanie najoptymalniejszych warunków pomiarowych.

Strona | 4

Pani mgr Renata Wojnarowska-Nowak opracowała metodologię syntezy bionanokompleksu nanocząstka – enzym oksydazy cholesterolowej oraz przeprowadziła szereg pomiarów, głównie technikami spektroskopii oscylacyjnej, wykazując wpływ linkera na efektywność wiązania enzymu ChOX i jego właściwości katalityczne. Oprócz typowych wiązań występujących dla bionanokompleksu udało się autorce rozprawy wyznaczyć linie markerowe SERS dla ChOX oraz cholesterolu, które pozwalają na jednoczesną analizę występowania tych molekuł. Wykonanie tak wielu różnorodnych analiz pozwoliło też na wyznaczenie struktur drugorzędowych oraz różnic w zakresie tzw. „finger print”.

Podczas lektury rozprawy nasunęły mi się pewne wątpliwości i uwagi, które niewątpliwie będą wyjaśnione podczas obrony. Należą do nich:

1. Czy określenie „przekrój poprzeczny absorpcji” (str. 14) dotyczy przekroju czynnego na absorpcję? Jeśli tak to czy mowa jest o przekroju czynnym całkowitym czy różniczkowym?
2. Wątpliwość budzi rys. 1.5. gdzie pokazane są  $\nu_m$  oraz  $\nu_{osc}$ ? Jaka jest różnica. Proszę też o wyjaśnienie dolnej części rysunku.
3. Co znaczy „negatywny wpływ na aktywność ChOX” – str.35
4. Proszę doprecyzować „skanowanie z prędkością 0,5-01 Hz” – str. 39
5. Proszę podać parametry wygładzania widm i wyjaśnić procedurę normalizacji – str. 44



6. Proszę wyjaśnić określenie „odpowiednio dobierano...” – str. 49
7. W tabeli 4.2 nie podano niepewności pomiarowych.
8. Na str. 54 podano stężenia nanocząstek przy użyciu I metody ich wytwarzania. Nie podano tych stężeń w przypadku metody II. Dlaczego więc autorka podaje stężenia dla I metody? Do czego wykorzystana jest ta informacja?
9. Proszę wyjaśnić procedurę wyznaczania rozmiarów (średnicy) nanocząstek. – str. 55
10. Proszę wyjaśnić lokalne maksimum na wykresie 4.7 dla 50 nm rozmiaru nanocząstki.
11. Proszę wyjaśnić w stosunku do czego intensywność pasma przypisywanego do konformacji gauche jest wyższa – str. 92
12. Autorka dokonuje porównania widm SERS – rys. 6.8 w zależności od użytego lasera. Porównanie jest dla pomiarów wykonanych w różnych warunkach – dlaczego?
13. We wnioskach końcowych doktorantka używa określenia „Do najważniejszych, z naszego punktu widzenia, uzyskanych rezultatów należą...” Czy znaczy to, że przedstawione wyniki badań zostały osiągnięte przez kilku autorów? A jeśli tak, to proszę podać wkład autorki w przeprowadzenie tych badań oraz ich interpretację.

Niestety, muszę też zwrócić również uwagę na liczne błędy edytorskie mogące świadczyć o pośpiechu przygotowania rozprawy, które jednak nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy. Z uwagi na ich mnogość nie będą tu wymienione, jednakże planując publikację tej rozprawy należałoby je usunąć. Natomiast zalecałbym wykonanie erraty i dołączenie jej do rozprawy znajdującej się w zasobach bibliotecznych.

Mimo tych paru krytycznych uwag, należy podkreślić, że rozprawę czyta się z przyjemnością albowiem autorka zadbała o logikę i przejrzystość tekstu.

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki z przeprowadzonych badań mają istotny wpływ na rozwój technik pozwalających na syntezę nanocząstek wykorzystywanych dla badań biomedycznych. Do najważniejszych rezultatów rozprawy niewątpliwie należy opracowanie technologii wytwarzania bionanokompleksu AuNP-ChOX oraz zbadanie jego właściwości. Dlatego też,



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ  
im. Henryka Niewodniczańskiego  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

biorąc pod uwagę ogrom pracy, jaki został włożony przez Panią mgr Renatę Wojnarowską-Nowak w opracowanie tej rozprawy oraz przeprowadzenie eksperymentów jak też opracowanie otrzymanych wyników pomiarowych wraz z ich interpretacją, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora* i **wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Renaty Wojnarowskiej-Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Strona | 6

Prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek