



Politechnika Łódzka

Instytut Technologii Polimerów i Barwników

Łódź, 28 sierpnia 2024

prof. dr hab. inż. Joanna Pietrasik
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Janiszewskiej

**pt. Charakterystyka wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości
cienkich warstw oraz ich oddziaływania z białkami**

Promotor: dr hab. Kamil Awiuk, prof. UJ

Biomateriały to materiały o bardzo szerokiej gamie zastosowań. Szczególną rolę wśród tych materiałów zajmują tzw biokoniugaty. Powstają one na skutek połączenia biomakromolekuł, takich jak peptydy czy białka, z syntetycznymi polimerami. Należy podkreślić, iż biokoniugaty odgrywają kluczową rolę w tworzeniu zaawansowanych materiałów o określonych funkcjach biologicznych. Materiały te zostały po raz pierwszy opracowane w celu wydłużenia czasu krążenia białek *in vivo* poprzez ochronę za pomocą kowalencyjnie przyłączonego poli(glikolu etylenowego) (PEG), procesu znanego obecnie jako PEGylacja.

Alternatywą są układy, w których pomiędzy łańcuchem polimeru, a aktywną cząsteczką proteiny czy białka istnieją oddziaływania natury fizycznej. Są one również kluczowe dla rozwoju nowoczesnych terapii, diagnostyki oraz inżynierii biomateriałów. Dzięki możliwości kontrolowania tych interakcji, naukowcy mogą projektować materiały o ściśle określonych funkcjach, które wspierają zdrowie człowieka, poprawiają efektywność leczenia oraz przyczyniają się do postępów w badaniach nad różnymi chorobami.

W tym kontekście przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Natalii Janiszewskiej, której celem było zbadanie wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości uzyskanych cienkich warstw oraz ich oddziaływania z wybranymi białkami wpisuje się w aktualne trendy badań dotyczących układów polimer - białko.

Co ważne Pani mgr Natalia Janiszewska udowodniła, że struktura łańcuchów polimerowych wpływa na właściwości powierzchniowe ich cienkich warstw, a tym samym na oddziaływania tych warstw z biomolekułami poprzez determinowanie konformacji i orientacji białek, które adsorbują się na badanych powierzchniach. Warto



ul. Stefanowskiego 16, 90-537 Łódź, budynek A8
tel. +48 42 631-32-10, e-mail: polbarw@info.p.lodz.pl, www.polimbarw.p.lodz.pl
Adres do korespondencji:
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź



zaznaczyć, że kontrola oddziaływań na poziomie pojedynczych molekuł stwarza możliwości syntezy bardzo precyzyjnych materiałów funkcjonalnych.

Recenzowana praca liczy 120 stron. Układ dysertacji jest tradycyjny. Na początku Autorka przedstawiła swój dorobek naukowy, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz spis treści. Następnie zawarła część teoretyczną, po której następuje część eksperymentalna, w której Autorka opisała stosowane materiały i techniki badawcze. Kolejne cztery rozdziały poświęcone zostały wynikom badań własnych, w których Pani mgr Natalia Janiszewska przeanalizowała wpływ taktyczności oraz architektury homopolimerów, kopolimerów lub blend polimerowych na ich oddziaływanie z peptydami, białkami oraz bakteriami. W dalszych częściach pracy autorka zawarła podsumowanie, bibliografię oraz spis tabel i rysunków.

Część literaturowa, licząca 17 stron, stanowi spójny i przemyślany tekst. Wprowadza ona czytelnika w ogólną wiedzę na temat polimerów oraz ich mieszanin. Jeden z rozdziałów poświęcono kopolimerom, ze szczególnym uwzględnieniem kopolimerów blokowych i metod ich syntezy. W tej części znajdują się również informacje na temat białek i ich struktury. Dwie kolejne sekcje omawiają metody immobilizacji białek na powierzchniach oraz czynniki kluczowe dla tego procesu. Przedstawione zagadnienia są bez wątpienia istotne dla zrozumienia wyników badań opisanych w dalszej części pracy.

Krótkie podsumowanie uwypukla znaczenie problemu immobilizacji białek na powierzchniach, którym w swoich badaniach zajęła się Pani mgr Natalia Janiszewska. Wybrane do badań polimery i kopolimery są powszechnie stosowane, co niewątpliwie daje solidną podstawę do dalszego rozwijania tego zagadnienia.

Odnosząc się do tej części rozprawy, pragnę zwrócić uwagę na nieprecyzyjne przedstawienie metod otrzymywania kopolimerów blokowych. Proszę o dokładniejsze sprecyzowanie tego zagadnienia. Szczególnie istotne jest podkreślenie, że kopolimeryzacja nie musi zachodzić w selektywnym rozpuszczalniku. Jednak w przypadkach, gdy proces ten odbywa się w takim środowisku, mówimy o układach typu PISA (Polymerization-Induced Self-Assembly), gdzie brak mieszalności z rozpuszczalnikiem obecnym w mieszaninie reakcyjnej prowadzi do samoporzędkowania się układu podczas reakcji polimeryzacji.

Rozdział drugi szczegółowo opisuje materiały oraz metody badawcze stosowane do analizy badanych układów. Materiały zostały scharakteryzowane pod kątem ich właściwości fizykochemicznych, metod otrzymywania oraz zastosowań. W tej części również zwrócono uwagę na elementy nowatorskie przygotowanej rozprawy.

Do badań Pani mgr Natalia Janiszewska wybrała poli(metakrylan *tert*-butylu) (P*t*BMA), poli(metakrylan metylu) (PMMA) oraz poli(styren-*b*-glicydol) (P(S-*b*-GL)). W badaniach z udziałem P*t*BMA analizowała wpływ taktyczności na immobilizację peptydów, białek oraz adhezję bakterii. W przypadku PMMA, skupiła się na wpływie stereoregularności tego polimeru na orientację osadzonych białek. Stosowała również

mieszaninę PMMA oraz P*t*BMA. Natomiast dla kopolimeru P(S-*b*-GL) badała wpływ architektury pojedynczego łańcucha, stosując zarówno kopolimer liniowy, jak i o strukturze grzebieniowej.

Do badań wybrała następujące białka: surowiczą albuminę wołową (BSA), immunoglobulinę typu G (IgG), fibrynogen (Fib), owalbuminę (OVA), lizozym oraz streptawidynę (STR). BSA jest powszechnie stosowane w badaniach dotyczących immobilizacji białek na powierzchni, natomiast IgG pozwala na ocenę aktywności zaadsorbowanych białek. Pozostałe białka zostały wybrane ze względu na różnice w ich rozmiarze, kształcie oraz punkcie izoelektrycznym.

Zawarte informacje opisujące stosowane metody badawcze z pewnością ułatwiają zrozumienie otrzymanych wyników, a także pozwalają przewidzieć ograniczenia poszczególnych technik.

Badania własne i dyskusja wyników obejmują cztery spójne rozdziały.

W pierwszym z nich Pani mgr Natalia Janiszewska opisała badania dotyczące wpływu trzech stereoregularnych form P*t*BMA na adsorpcję peptydów i białek oraz interakcje warstw polimerowych ze szczepami bakterii. Podłoża z naniesioną warstwą polimeru, uzyskane metodą spin-coating, zostały scharakteryzowane za pomocą mikroskopii AFM, pomiarów kąta zwilżania, spektroskopii fotoelektronów oraz spektrometrii mas jonów wtórnych. Efektywność immobilizacji substancji badanych oceniono na podstawie wyników mikroskopii fluorescencyjnej, techniki ToF-SIMS oraz spektroskopii XPS. Analiza wyników pokazała, iż najbardziej efektywna z punktu widzenia oddziaływań podłoża z peptydami, białkami oraz szczepami bakterii jest forma izotaktyczna P*t*BMA. Autorka uwzględniła rolę oddziaływań elektrostatycznych, możliwości tworzenia wiązań wodorowych, czy oddziaływań hydrofobowych.

W odniesieniu do tej części rozprawy proszę o skomentowanie czy w przypadku tworzenia na powierzchni obszarów krystalicznych będzie miało to odzwierciedlenie w chropowatości powierzchni.

W kolejnej części pracy Pani mgr Natalia Janiszewska zajęła się analizą wpływu taktyczności polimeru na orientację białek osadzonych na jego powierzchni. W tym celu wybrała PMMA o różnej stereoregularności, tj. formy izo-, syndio- i ataktyczną, na których przeprowadziła adsorpcję białka. Podobnie jak w poprzednim rozdziale, warstwy polimeru zostały scharakteryzowane za pomocą mikroskopii AFM, pomiarów kąta zwilżania oraz spektrometrii mas jonów wtórnych. Efektywność immobilizacji badanych substancji oraz zmiany w orientacji i konformacji zaadsorbowanych białek oceniono na podstawie analizy za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oraz techniki ToF-SIMS, połączonej z analizą PCA.

W tym przypadku okazało się, że izotaktyczna konformacja PMMA nie sprzyjała adsorpcji białka na badanych powierzchniach. Proces ten był bardziej efektywny w przypadku PMMA o syndiotaktycznej i ataktycznej konformacji łańcuchów. Efekt ten jest o tyle nieoczywisty, iż energia powierzchniowa jest najmniejsza dla izomeru izotaktycznego, podobnie jak w przypadku warstw otrzymanych z P*t*BMA.

Proszę o komentarz czy Doktorantka rozważyła wpływ rozpuszczalnika, z którego wylewano filmy, na orientację warstwy polimerowej. Zakładam, że szybkość odparowywania toluenu była większa niż chlorobenzenu ze względu na różnice w wartościach temperatury wrzenia tych rozpuszczalników.

Naturalnym rozwinięciem omawianej koncepcji badań było zastosowanie mieszaniny polimerów o zróżnicowanej taktyczności, PMMA i P α BMA. Ze względu na niemieszalność tych dwóch polimerów, tworzą one domeny, których rozmiary zależą od wielu czynników związanych zarówno z metodą ich wytwarzania, jak i charakterystyką molekularną polimerów. W badaniach Pani mgr Natalia Janiszewska zastosowała dwie techniki tworzenia cienkich warstw: spin-coating oraz horizontal dipping. Dodatkowo, wykorzystwała technikę druku mikrokontaktowego do wytworzenia uporządkowanych wzorów polimerowych. W kolejnym etapie badała interakcje białek z wygenerowanymi podłożami polimerowymi oraz analizowała ich aktywność biologiczną. Głównym celem było stworzenie mikromacierzy białkowych o specyficznej dystrybucji tych molekuł, z zachowaniem ich aktywności. Do badań otrzymanych układów wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną, mikroskopię AFM oraz spektroskopię Ramana. Uzyskane wyniki Doktorantka omówiła w osobnym rozdziale. Wykorzystując separację fazową badanej mieszaniny, jak i zróżnicowane powinowactwo białek do składników mieszaniny z sukcesem otrzymała selektywne podłoża białkowe osadzone na warstwach polimerowych z zachowaniem aktywności biologicznej zaadsorbowanych białek.

W ostatnim rozdziale opisującym wyniki badań Doktorantka przedstawiła badania, w których wykorzystwała kopolimery blokowe, zawierające odpowiednio blok o charakterze hydrofobowym, tj. polistyren, oraz blok hydrofilowego poliglicydolu o liniowej bądź grzebieniowej topologii łańcucha. W ten sposób możliwym było odniesienie się do roli składu i architektury łańcucha polimerowego w procesie adsorpcji białek na powierzchni warstw polimerowych. Synteza polimerów została wykonana przez zespół p. prof. dr hab. Teresy Basińskiej, PAN. Charakterystykę powierzchni przeprowadzono za pomocą profilometrii, mikroskopii AFM, mikroskopii fluorescencyjnej, pomiarów kąta zwilżania oraz spektrometrii mas jonów wtórnych. Naniesione na powierzchnie krzemu warstwy polimerowe ekspozowano na działanie wody bądź buforu PBS w celu określenia ich stabilności oraz różnic w składzie warstwy na powierzchni. Jak się okazało inkubacja w wodzie miała duży wpływ na oddziaływanie białek z powierzchnią kopolimeru o budowie grzebieniowej.

Nasuwa się pytanie czy zdaniem Doktorantki możliwe jest, iż ilość łańcuchów tworzących warstwę polimerową nie jest taka sama w przypadku liniowej i grzebieniowej architektury łańcucha, nawet jeśli grubości warstw w obu przypadkach są podobne. Wobec powyższego czy może mieć to wpływ na efektywność adsorpcji białek na badanych powierzchniach?

Dysertację zamyka podsumowanie, w którym Pani mgr Natalia Janiszewska podkreśliła swoje najważniejsze osiągnięcia wynikające z prowadzonych badań. Warto

zaznaczyć, że opisane przez Panią mgr Natalię Janiszewską badania są nowatorskie i w istotny sposób wzbogacają istniejący stan wiedzy w zakresie adsorpcji białek na powierzchniach polimerowych. Uzyskane wyniki z pewnością otwierają drogę do dalszego rozwoju tego obszaru badawczego.

W mojej ocenie Pani mgr Natalia Janiszewska wykonała sumienną pracę eksperymentalną, która wymagała szerokiej wiedzy z zakresu chemii, fizykochemii polimerów oraz biologii. Wyniki jej badań stawiają przed czytelnikiem wiele interesujących pytań, które bez wątpienia przyczynią się do dalszego rozwoju tego tematu badawczego.

Oczywiście w rozprawie można zauważyć drobne błędy edytorskie, takie jak brakujący nawias w nazwie polimeru, niewłaściwy zapis kopolimeru (należy pamiętać o użyciu pochyłej czcionki w części nazwy dotyczącej typu kopolimeru), czy też błędne stwierdzenie o hydrofilowym charakterze PMMA. Są to jednak niewielkie niedociągnięcia, które nie wpływają na ocenę merytoryczną rozprawy.

W swoim dorobku Pani mgr Natalia Janiszewska ma 2 publikacje, które wchodzą w skład rozprawy, które ukazały się w czasopismach o dużym współczynniku IF; jest w nich pierwszym autorem. Ponadto jest również współautorem 6 innych publikacji w renomowanych czasopismach. Wyniki otrzymanych prac prezentowała na 6 konferencjach krajowych i zagranicznych. Uczestniczyła również w realizacji trzech projektów badawczych, w dwóch pełniła rolę kierownika. Jest to bardzo dobry dorobek na tym etapie drogi zawodowej.

Uznaję zatem, iż przedstawiona praca w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Janiszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



