

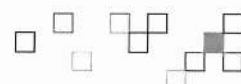
Lublin, 31.05.2021

Recenzja

osiągnięcia naukowego w formie cyklu publikacji pod tytułem „Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań biomedycznych” Pani dr Anny Bratek-Skicki w postępowaniu o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Podstawowe informacje o Kandydatce

Pani dr Anna Bratek-Skicki uzyskała stopień doktora nauk chemicznych w dniu 18 czerwca 2009 roku decyzją Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. Promotorem rozprawy zatytułowanej „Influence of Adsorbed Polyelectrolytes on the Kinetics of Colloid Particle Deposition and the Topology of Their Monolayers” był Prof. dr hab. inż. Zbigniew Adamczyk (rozprawa z wyróżnieniem). Według załączonej dokumentacji, Kandydatka nie ubiegała się wcześniej o nadanie stopnia doktora habilitowanego. W latach 2004-2006 Pani dr Anna Bratek-Skicki była uczestniczką studiów doktoranckich w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie. Po uzyskaniu stopnia doktora w tej jednostce odbyła staż postdoc w University College of Dublin (2009-2010). Po powrocie do kraju, w latach 2010-2015, zajmowała stanowisko chemika w IKiFP PAN w Krakowie. W ramach uzyskanego indywidualnego Stypendium im. Marii-Curie pracowała jako postdoc (lata 2015-2017) a następnie jako Visting Researcher (2017-2018) w Université Catholique de Louvain. Począwszy od roku 2018 do chwili obecnej jest zatrudniona na stanowisku Senior Postdoctoral Researcher w belgijskim uniwersytecie Vrije Universiteit Brussel. Pani dr Bratek-Skicki jest jednocześnie pracownikiem Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN im. Jerzego Habera w Krakowie (Grupa Badawcza Adsorpcja/Koloidy).



2. Obowiązujące przepisy

Według obowiązującej ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Art. 291.1. Stopień doktora habilitowanego nadaje się osobie, która:

- 1) posiada stopień doktora;
- 2) posiada w dorobku osiągnięcia naukowe albo artystyczne, stanowiące znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny, w tym co najmniej (w odniesieniu do Kandydatki):
 - b) 1 cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych lub w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b.

3. Informacje o ocenianych osiągnięciach naukowych

Osiągnięciem naukowym Kandydatki stanowiącym podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego jest cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, o których mowa w punkcie b) Art 291.1.1 ustawy. Cykl ten zatytułowany jest „Adsorpcja białek na nośnikach polimerowych do zastosowań biomedycznych” i obejmuje jedenaście artykułów o sumarycznym 5-letnim współczynniku Impact Factor równym 60,513. Wspomniane prace opublikowane zostały na łamach czasopism, takich jak Langmuir (H1, H2, H9), Current Topics in Medicinal Chemistry (H4, H5), Colloids and Surfaces B (H3), Soft Matter (H6), Nanoscale (H7), ACS Nano (H8), Biomacromolecules (H10) i Polymers (H11). Cytowane były łącznie 176 razy (150 raz bez cytowań własnych). Czasopisma, w których wyniki swych badań opublikowała Kandydatka są jednymi z najważniejszych periodyków w zakresie chemii fizycznej zjawisk międzyfazowych, nanotechnologii, chemii polimerów i chemii medycznej. Charakteryzują się wysokim lub bardzo wysokim współczynnikiem IF, tj: Langmuir – 4,416; Current Topics in Medicinal Chemistry – 3,632; Colloids and Surfaces B – 4,226; Soft Matter - 3,957 (nie jak podaje Autorka 3,632); Nanoscale - 7,713; ACS Nano - 13.951; Biomacromolecules - 5.775 i Polymers - 3,636. Według informacji podanych we wniosku i oświadczeń współautorów, udział Pani dr Anny Bratek-Skicki w opracowaniu publikacji wynosił odpowiednio: 40% (H7, H8), 50% (H1), 55% (H2, H3, H4), 65% (H5), 70% (H6), 80% (H9, H10) i 100% (H11). Kandydatka występuje jako pierwszy autor w pracach H2, H3, H4, H6, H9, H10 i H11 i jako autor korespondujący w pozycjach H4, H9 i H10. Biorąc pod uwagę liczbę współautorów tych prac (od 2 do 6), zestawione powyżej dane pozwalają mi stwierdzić, że wkład Pani dr Anny

Bratek-Skicki w przygotowanie publikacji cyklu był dominujący i pełniła Ona wiodącą rolę w realizacji badań.

Całkowity dorobek naukowy Pani dr Anny Bratek-Skicki obejmuje 22 pozycje, w tym 19 artykułów naukowych z bazy Journal Citation Reports, jeden rozdział w monografii (pozycja A, str. 54) oraz dwie publikacje w czasopismach nie mających współczynnika IF (pozycje 2 i 3, str. 53). Pięć z tych artykułów zostało obliczanych przed uzyskaniem stopnia doktora a sześć, nie ujętych w cyklu prac H1-H11, po uzyskaniu tego stopnia. Sumaryczna punktacja IF wspomnianych 22 pozycji wynosi 94,786; klasyfikacja MNiSW daje w sumie 709 punktów. Prace te były cytowane łącznie 385 razy (315 razy bez cytowań własnych). Indeks Hirscha Autorki równy jest 12.

Tematyką łączącą prace cyklu jest szeroko rozumiana adsorpcja białek na powierzchniach polimerowych. Z praktycznego punktu widzenia zagadnienia z tego obszaru nauki mają fundamentalne znaczenie dla rozwoju współczesnych metod diagnostyki medycznej i analityki biomolekuł, wytwarzania implantów biomedycznych, projektowania leków i nośników ich dostarczania. Adsorpcja białek na powierzchniach ciał stałych, w tym na powierzchniach polimerów, jest zjawiskiem bardzo skomplikowanym ze względu na złożoną budowę tych cząsteczek. Obecność i ekspozycja różnych grup funkcyjnych, zależna od konformacji białka, są czynnikami, które w silny sposób warunkują złożone oddziaływanie biomolekuł z podłożem. Co więcej, zmiany konformacyjne, zarówno w fazie objętościowej jak i te zachodzące pod wpływem adsorpcji mogą w znacznym stopniu zmieniać aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne białek. Wszystkie te zjawiska utrudniają zrozumienie mechanizmów interakcji białek i powierzchni materiałów takich jak polimery organiczne, kryształy metaliczne, grafit i inne substraty nieorganiczne. Z tych właśnie przyczyn, zaawansowane badania eksperymentalne i teoretyczne adsorpcji białek są niezbędne do wyjaśnienia i przewidywania odpowiednich procesów zachodzących na granicy faz ciecz-ciało stałe. Cykl prac H1-H11 doskonale wpisuje się w ten trend, ilustrując wysiłki Kandydatki, które podjęła w celu opracowania nowych metod immobilizacji białek na powierzchniach ciał stałych. Wybór tej tematyki uważam, za dobrze uzasadniony, mając na uwadze potencjalne zastosowania badanych układów oraz szeroki aspekt poznawczy podjętych badań.

Najważniejsze wyniki badań Autorka zamieściła w dziewięciu pracach oryginalnych H1-H4 i H7-H11 i dwóch artykułach przeglądowych H5 i H6. W pierwszej z oryginalnych publikacji skoncentrowała się na opisie adsorpcji fibrynogenu wołowego na powierzchni mikrosfer polimerowych PS. Do swych badań wykorzystwała pomiary ruchliwości elektroforetycznej sfer polimerowych, na których, przy zadanym pH i sile jonowej roztworu, adsorbował się fibrynogen. Do analizy badanych układów użyte zostały ponadto pomiary współczynników dyfuzji za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz mikroskopii sił atomowych (AFM) - w celu pośredniego określenia stopnia pokrycia sfer przez fibrynogen. Wyznaczone właściwości dyspersji

fibrynogenu i sfer polimerowych posłużyły do określenia zależności ruchliwości elektroforetycznej białka i średnicy hydrodynamicznej mikrosfer polimerowych w funkcji pH i siły jonowej. Ważnym wynikiem tego etapu badań było wyznaczenie wpływu pokrycia powierzchni sfer na wielkość potencjału ζ w badanych układach. Powiązanie tych wielkości to oryginalna metoda umożliwiająca badanie adsorpcji białek na sferach polimerowych w oparciu o mierzone wartości potencjału ζ . Autorka wykazała przy tym ograniczoną stosowalność modelu Gouy-Chapmanna i zaproponowała dwuetapowy mechanizm adsorpcji cząsteczek fibrynogenu: w orientacji przypadkowej dla niskich sił jonowych roztworu i w orientacji płaskiej dla wyższych sił jonowych i wyższym pH. Wyniki analogicznych badań, dotyczących adsorpcji fibrynogenu ludzkiego, opisane zostały w drugiej pracy cyklu H2. Tutaj głównym celem Kandydatki było opisanie efektów wywołanych zmienną siłą jonową roztworu białka, kontrolowaną stężeniem NaCl. Zestaw rezultatów eksperymentalnych, podobnych do tych przedstawionych w pracy H1 (np. odpowiednie zależności potencjału ζ) pozwolił na sformułowanie interesujących wniosków dotyczących mechanizmu adsorpcji fibrynogenu w warunkach zmiennej siły jonowej. W szczególności, były to: istotny wzrost maksymalnego pokrycia mikrosfer ze wzrostem siły jonowej oraz specyficzna prostopadła orientacja cząsteczek białka odpowiedzialna za tworzenie struktury typu szczotki.

W kolejnej pracy H3 Autorka opisała wyniki szczegółowych badań nad wpływem pH i siły jonowej na stabilność warstw adsorpcyjnych fibrynogenu wołowego na powierzchni mikrosfer PS. Eksperymenty przeprowadzone dla szerokiego zakresu pH potwierdziły zaproponowany wcześniej mechanizm nieodwracalnej adsorpcji cząsteczek fibrynogenu w orientacji prostopadłej i płaskiej, odpowiednio dla niskich i wysokich wartości pH. Anomalny wzrost adsorpcji białka obserwowany przy pH równym 7.4 wytłumaczony został niejednorodnym rozkładem ładunku elektrycznego cząsteczki, która przy tym pH, chociaż jako całość ma ładunek ujemny, to występują w niej fragmenty naładowane dodatnio – odpowiedzialne za interakcję z ujemnie naładowanym polimerem. Ten heterogeniczny rozkład ładunku był przedmiotem szczegółowych badań opisanych w następnym artykule cyklu, H4. Zaproponowany tam rozkład ładunku w uproszczonej strukturalnie cząsteczce fibrynogenu ludzkiego w połączeniu z modelem elektrokinetycznym 3D dał bardzo dobrą zgodność z wynikami eksperymentalnymi (np. potencjał ζ jako funkcja stężenia białka). Dodatkowe badania eksperymentalne przeprowadzone dla tego białka pokazały stabilność sfer polimerowych (do 30 godzin) zarówno dla niewielkiej jak i dużej siły jonowej roztworu. Rezultaty te uważam za bardzo cenne ze względu na ich praktyczne znaczenie w preparatyce stabilnych nośników biomolekuł. Materiał badawczy opisany w pracach H1-H4 podsumowany został w dwóch artykułach przeglądowych H5 i H6, w których swoje dane Autorka zestawiała z informacjami literaturowymi na temat adsorpcji fibrynogenu na powierzchniach ciał stałych. W artykułach tych opisała najważniejsze techniki eksperymentalne i modele teoretyczne stosowane do analizy układów

adsorpcyjnych typu fibrynogen/PS oraz przedstawiła zależności charakteryzujące stabilność tych układów.

Druga grupa prac Autorki, H7-H11, dotyczy innych już sposobów tworzenia układów hybrydowych typu nośnik-białko. Pierwszym z nich, analizowanym w artykułach H7 i H8 było konstruowanie kompleksów białkowo-polielektrolitowych zawierających lizozym i poli(styreno-4-sulfonian sodu) (PSS). Za główne osiągnięcie Pani dr Bratek-Skicki w tym obszarze uznać należy opracowanie efektywnej metody wytwarzania warstwowych kompleksów zawierających lizozym i matrycę opartą o PSS i chlorowoderek poli(alliloaminy) (PAH). Jak pokazała Autorka, proste kompleksy lizozym-PSS są stabilne przez długi okres czasu (do jednego tygodnia) i ich rozmiar (charakteryzowany za pomocą promienia hydrodynamicznego) jest w niewielkim stopniu uzależniony od pH, co jest zaletą biorąc pod uwagę potencjalne zastosowania praktyczne tych układów. W przypadku kompleksów wielowarstwowych, badania Kandydatki dowiodły, że specyficzna aktywność lizozymu wbudowanego w złożone struktury PSS-PAH jest wyższa w porównaniu do analogicznej aktywności tego białka w roztworze. Zaprezentowana możliwość immobilizacji białka bez utraty jego aktywności biologicznej jest istotnym wynikiem, który może przyczynić się do rozwoju metod programowanego dostarczania leków i biokatalizy. Kontrolowane uwalnianie białka z powierzchni polimerowych stały się przedmiotem dalszych badań Autorki, opisanych w trzech ostatnich pracach cyklu H9, H10 i H11.

Wspomniana wyżej grupa prac dotyczy wiązania mieszanych szczotek polimerowych na powierzchni złota i adsorpcji białek na tak spreparowanym podłożu. W pierwszym etapie badań Pani dr Bratek-Skicki zajmowała się syntezą i charakterystyką szczotek polimerowych zbudowanych z kwasu poli(akrylowego) (PAA) i tlenku poli(etylenu) PEO. Eksperymenty, które prowadziła polegały na pomiarze adsorpcji i desorpcji cząsteczek albuminy, lizozymu oraz fibrynogenu w obecności szczotek mieszanych o różnym stosunku PAA:PEO, przy różnej sile jonowej roztworu i ustalonym pH. Wyniki zebrane w pracy H9 wykazały, że poprzez odpowiedni dobór składu fazy polimerowej kontrolować można adsorpcję białek, ograniczając ją zupełnie (szczotki PEO) lub zwiększając istotnie (lizozym i albumina/szczotki mieszane). Co więcej, dane te potwierdziły, że proces adsorpcji prowadzić można w sposób odwracalny, zmieniając odpowiednio siłę jonową w układzie. Konkluzje badań Autorki w tym obszarze uważam za bardzo cenne ze względu na ich znaczenie dla rozwoju metod wytwarzania nośników biomolekuł umożliwiających uwalnianie sterowane przez czynniki zewnętrzne. Podobnie istotne spostrzeżenia znajdują się w kolejnej pracy H10, która dotyczy układów jeszcze bardziej skomplikowanych – zawierających mieszaninę trzech wspomnianych białek. Celem jak postawiła sobie w tym przypadku Pani dr Bratek-Skicki było zbadanie możliwości selektywnej adsorpcji składników mieszaniny w zależności od parametrów, takich jak skład podłoża (PAA/PEO) i siła jonowa roztworu. Zmierzone zależności wykazały między innymi, że dla niskiej siły jonowej

zachodzi selektywna adsorpcja lizozymu podczas gdy przy wyższej sile jonowej na szczotkach PAA/PEO adsorbuje się zarówno lizozym jak i albumina. Koncepcja sterowanej adsorpcji białek była dalej rozwijana przez Autorkę w ostatniej z prac cyklu H11, gdzie znajdują się wyniki dotyczące adsorpcji białek na szczotkach polimerowych PEO zawierających dodatnio naładowany polikation. Zaproponowane podejście polegało na zamianie stosowanego dotychczas modyfikatora, ujemnie naładowanego polianionu PAA, na łańcuchy polikationu poli(2-(dimetyloamino) metakrylanu etylu) (PDMAEMA) umożliwiającego adsorpcję białek anionowych. Pomiary przeprowadzone dla czterech białek (dodatkowo dla awidyny) wykazały, że na szczotkach PEO/PDMAEMA nie adsorbują się lizozym i awidyna (białka dodatnio naładowane). Z drugiej strony, zaobserwowano silną adsorpcję albuminy i fibrynogenu, która zmniejszała się stopniowo wraz ze wzrostem zawartości PEO w szczotkach polimerowych oraz ze wzrostem masy molowej tego składnika. Dodatkowe eksperymenty wykonane dla desorpcji indukowanej zmianą siły jonowej pozwoliły na określenie optymalnego składu szczotek polimerowych zapewniających całkowitą desorpcję badanych białek anionowych. Jak już wspomniałem, rezultaty tej części badań Autorki są szczególnie interesujące ze względu na ich poznawczy i aplikacyjny charakter.

Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej rezultaty badań Pani dr Bratek-Skicki stwierdzam, że stanowią one istotny wkład w rozwój fizykochemii białek i makrojonów. Opinię tę uzasadniają następujące osiągnięcia Autorki dotyczące opracowania metod immobilizacji białek i sposobów charakterystyki otrzymywanych układów adsorpcyjnych. Są to w mej ocenie: 1) rozwój metodologii pomiarów adsorpcji białek na sferach polimerowych z wykorzystaniem danych elektrokinetycznych, w tym nowy sposób określania punktu izoelektrycznego białek na podstawie właściwości odpowiednich układów białko/polimer. Sposób ten pozwala na wykorzystanie mniejszych ilości białka do analizy a przy tym dużą precyzję pomiaru. 2) Wyjaśnienie mechanizmu adsorpcji fibrynogenu na sferach polimerowych w zależności od pH i siły jonowej roztworu. Wyznaczenie warunków stabilności badanych układów. Określenie zmian orientacyjnych cząsteczek towarzyszących adsorpcji przy różnej sile jonowej roztworu. 3) Opracowanie metod immobilizacji białek z wykorzystaniem kompleksów białkowo-polielektrolitowych. Zbadanie sposobów tworzenia się wielowarstwowych kompleksów przy zmiennej sile jonowej. Wykazanie wyższej aktywności enzymatycznej białka skompleksowanego w porównaniu z układem objętościowym. 4) Synteza mieszanych szczotek polimerowych adsorbujących białka o ładunku dodatnim i ujemnym. Zaproponowanie sposobów kontrolowania adsorpcji przez zmianę pH i siły jonowej roztworu. Zademonstrowanie selektywnej adsorpcji białek z mieszanin, zachodzącej wskutek kontrolowanych zmian parametrów środowiska.

4. Informacje o innych osiągnięciach Kandydatki

Pani dr Anna Bratek-Skicki była autorką dwóch referatów na zaproszenie, 18 komunikatów ustnych (8 po doktoracie) i 39 prezentacji posterowych (23 po doktoracie). Wygłosiła również dwa wykłady na zaproszenie. Na szczególne podkreślenie zasługuje duża aktywność Kandydatki w zakresie współpracy naukowej w ramach projektów krajowych i zagranicznych. Była Ona kierownikiem projektu KNOW MNiSW dla młodych pracowników naukowych (2012-2013) i wykonawcą w jedenastu projektach finansowanych między innymi przez MNiSW, Narodowe Centrum Nauki, Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (POIG) oraz instytucje zagraniczne (np. prestiżowe stypendium Marii Skłodowskiej-Curie przyznane przez Komisję Europejską). Autorka była opiekunem dwóch prac magisterskich w instytucjach zagranicznych (Belgia) i pełniła funkcję promotora pomocniczego w postępowaniu doktorskim prowadzonym przez IKiFP im. Jerzego Habera w Krakowie. Znaczącą formą aktywności naukowej Autorki jest współpraca z otoczeniem przemysłowym, to jest z dwoma polskimi firmami produkującymi szczepionki (BIOMED) i testy laboratoryjne (BIOMEX). Warty wspomnienia jest również działalność ewaluacyjna i popularyzatorska Pani dr Bratek-Skicki, polegająca na ocenianiu wniosków NCN i Komisji Europejskiej (program Marii Skłodowskiej-Curie), recenzowaniu artykułów naukowych, prezentacji popularnonaukowej badań IKiFP im. Jerzego Habera PAN w ramach Dni Otwartych oraz udział w podobnych przedsięwzięciach w kraju i zagranicy (np. Forum Euro Science, UK).

5. Podsumowanie i konkluzja

Przedstawione we wniosku osiągnięcia Pani dr Anny Bratek-Skicki pozwalają mi wyrazić pozytywną opinię odnośnie nadania Jej stopnia doktora habilitowanego. Uważam, że osiągnięcia te są znaczącym wkładem w rozwój dyscypliny nauki chemiczne i spełniają wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W szczególności, sądzę, że wyniki badań Autorki wniosku poszerzają znacząco wiedzę o metodach immobilizacji białek i ich kontrolowanej adsorpcji na powierzchniach polimerowych do zastosowań biomedycznych. Według mojej oceny Kandydatka wykazała się istotną aktywnością naukową, która dokumentują przede wszystkim jej opublikowane prace, prezentacje wyników na konferencjach naukowych, udział w projektach badawczych, współpraca z podmiotami gospodarczymi a także działalność dydaktyczna i popularyzatorska. Biorąc pod uwagę te osiągnięcia wnioskuję o dopuszczenie Pani dr Bratek-Skicki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

