



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA  
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ i BIOCHEMII

Prof. dr hab. inż. Bogusław Baś

Kraków, dn. 15.02.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Magdaleny Tobolskiej  
pt. „Projektowanie receptorów molekularnych wykorzystujących  
metalokompleksy peptydowe”**

Recenzowana praca doktorska została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem dwóch opiekunów, prof. dra hab. inż. Wojciecha Wróblewskiego z PW i prof. dra hab. Sławomira Sęka z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Jako źródło finansowania badań Doktorantka wskazuje następujące projekty: Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Od chemii do bioinnowacji” TRI-BIO-CHEM w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego; projekt NCN PRELUDIUM 20 i projekt wewnętrzny IDUB-PW. Interdyscyplinarny zespół, skupiający naukowców z dwóch czołowych polskich uczelni (UW i PW) oraz Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, w którym Doktorantka prowadziła badania i przygotowała dysertację to przodująca w świecie grupa badawcza, zajmująca się nowoczesnymi biosensoremami. Rzetelne, merytoryczne wsparcie zespołu jakie niewątpliwie uzyskała Doktorantka, przełożyło się na przełomową jakość osiągniętych rezultatów i szerokie uznanie międzynarodowego środowiska naukowego, czego dowodem są artykuły opublikowane w prestiżowych czasopismach. Uwagę przykuwa długa lista podziękowań, która świadczy o wyjątkowej skromności, pracowitości oraz wysokiej kulturze osobistej Doktorantki. Jako cel rozprawy mgr inż. Aleksandra M. Tobolska zgłasza opracowanie nowej klasy oryginalnych receptorów molekularnych, selektywnych względem anionów fosforanowych(V), wykorzystujących metalokompleksy peptydowe oraz dogłębną charakterystykę ich właściwości fizykochemicznych. Jak dowiodła, te ostatnie wyróżnia możliwość modyfikacji struktury, w efekcie podmiany jonu centralnego i/lub sekwencji aminokwasowej peptydu, a w konsekwencji funkcjonalizacji ich właściwości. W badaniach Doktorantki kluczową rolę w rozpoznawaniu anionów w obecności złożonej matrycy fizjologicznej (przyszłościowo również środowiskowej), odegrały związki zbudowane z kationu Cu(II) lub Ni(II) pełniące rolę centrum koordynacji oraz ligandu peptydowego, w którym histydyna zajmuje drugie miejsce w sekwencji aminokwasowej His2 (XHZ). Oryginalność tego podejścia wynika z faktu, że kation metalu pełni funkcję zarówno centrum rozpoznającego analit, jak i elektrochemicznie aktywnego „znacznika” redoks, który umożliwia monitorowanie oddziaływań receptor-analit za pomocą technik elektroanalitycznych, takich jak np. woltamperometria. Co ważne, wspomniane wyżej związki o unikalnych właściwościach koordynacyjnych nie były dotychczas stosowane do rozpoznawania molekularnego, co potwierdza innowacyjność podjętej tematyki badań.



**Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
Katedra Chemii Analitycznej i Biochemii**

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków,

tel. +48 12 617 2529, +48 12 617 2473, 604 616 574

e-mail: [bas@agh.edu.pl](mailto:bas@agh.edu.pl), [www.agh.edu.pl](http://www.agh.edu.pl), <http://home.agh.edu.pl/~kca/home/>

Rozprawę doktorską mgr inż. A.M. Tobolskiej cechuje bardzo wysoki poziom merytoryczny oraz potencjał aplikacyjny dlatego z pełnym podziwu uznaniem odnoszę się do zawartych w niej treści, stylu podjętej narracji, nie pozostawiających żadnych wątpliwości czy niedomówień komentarzy oraz co równie ważne perfekcyjnej redakcji językowej oraz składu graficznego pracy przekazanej do druku. Bez wątpienia, niezwykle bogaty warsztat badawczy zapewnili Doktorantce obaj opiekunowie, a nad stroną edytorską pracy czuwał zapewne prof. W. Wróblewski współautor i współredaktor cenionych podręczników dotyczących sensorów, biosensorów i mikrobioanalitiky.

Opiniowana rozprawa doktorska została przedłożona jako spójny tematycznie cykl **pięciu** artykułów naukowych, opublikowanych w prestiżowych czasopismach z bazy JCR w formie **114**-stronicowego zeszytu wydanego przez Oficynę Wydawniczą Politechniki Warszawskiej. Przedruki prac poprzedzają zamieszczone na wstępie streszczenia w języku polskim i angielskim oraz pięć rozdziałów, przy czym rozdział piąty to bibliografia, na którą składa się **58** cytowanych prac opublikowanych głównie w ostatnich latach. Rozdział pierwszy to kompendium aktualnej wiedzy a zarazem wyśmienite wprowadzenie w dziedzinę eksperymentu. W rozdziale drugim zawarto cel i zakres podjętych badań. Najbardziej obszerny jest trzeci rozdział, w którym opisano zwięźle przebieg oraz osiągnięte rezultaty badań będące przedmiotem wspomnianego cyklu artykułów. Rozdział piąty stanowi podsumowanie wraz z komentarzem i wnioskami końcowymi. Dysertację zwięźle wykaz pozostałych osiągnięć Doktorantki. Z satysfakcją stwierdzam, że podjęta w pracy dyskusja wyników potwierdza wysokie umiejętności krytycznej analizy ogólnie dostępnej wiedzy. Spójny i logicznie przedstawiony materiał dowodzi spełnienia wszystkich wymagań Ustawy w zakresie rozeznania literatury i opanowania odpowiedniego zakresu wiedzy w reprezentowanej dyscyplinie nauki.

Integralną częścią rozprawy są przedruki artykułów opublikowanych w czasopismach: *Inorganic Chemistry* (IF = 5.436, 2 prace), *Dalton Transactions* (IF = 4.569, 2 prace) oraz *Chemistry Proceedings*. Wymagania stawiane przez zespoły edytorskie tych czasopism potwierdzają innowacyjność prowadzonych badań i wysoką jakość uzyskanych wyników. Stwierdzam, że cykl ten jest zbiorem ściśle tematycznie powiązanych prac, co stanowi wymóg Ustawy. Sumaryczny współczynnik oddziaływania „*impact factor*” ww. publikacji jest wysoki i wynosi  $\Sigma IF_{2021} = 20,01$ , co w przeliczeniu na wartość średnią za artykuł daje  $IF_{sr.} = 4.00$ . Prace te były już cytowane **13** razy (bez autocytowań), co zważywszy na fakt, że ukazały się w latach 2020–2022 jest bardzo dobrym wynikiem. Doktorantka jest również współautorem **1** publikacji z poza cyklu w czasopiśmie *Dalton Transactions* (2022).

Artykuły stanowiące istotę osiągnięcia mgr inż. A.M. Tobolskiej są wieloautorskie dlatego do dysertacji dołączono oświadczenia o merytorycznym udziale wnoszonym przez poszczególnych współtwórców. Złożone oświadczenia nie pozostawiają wątpliwości co do wiodącej roli Doktorantki w ich przygotowaniu, tym bardziej, że aż w czterech z pięciu artykułów jest pierwszym i zarazem korespondencyjnym autorem. Bardzo wysoko oceniam aktywność Doktorantki w zakresie popularyzacji własnych wyników badań, co potwierdzają wygłoszone komunikaty i prezentowane plakaty na **11** konferencjach, w tym **6** międzynarodowych. Wiedzę, kreatywność i umiejętności organizacji badań i współpracy z zespołem potwierdzają projekty realizowane przez Doktorantkę. Była mianowicie kierownikiem projektu NCN PRELUDIUM20 (2021/41/N/ST4/00956) i wykonawcą w projektach: NCN OPUS 8 (2014/15/B/ST4/04807) oraz IDUB-PW BIOTECHMED-1 (2020/2021).

Rozprawę mgr inż. A.M. Tobolskiej oceniam bardzo wysoko, gdyż świadczy ona o wyjątkowej pracowitości, determinacji i wnikliwości badawczej Doktorantki, pasji z jaką ta młoda naukowczyni przystąpiła do realizacji własnych zainteresowań oraz nabytej przez niej umiejętności samodzielnego rozwiązywania problemów, co w moim odczuciu jest bardzo ważne w życiu naukowca. Co więcej, podjęte badania, osiągnięte rezultaty zwieńczone bardzo dobrymi, już zauważanymi przez środowisko, artykułami naukowymi mają nowatorski charakter, doskonale wpisują się w nowe strategie rozwoju nowoczesnych biosensorów elektrochemicznych i wnoszą znaczący wkład w rozwiązanie istotnego problemu badawczego. Pozostaję pod wrażeniem wykonanej pracy, jej rzetelności i formy prezentacji, to jedna z najlepszych dysertacji jaką miałem zaszczyt oceniać.

#### *Znaczenie podjętej tematyki*

Dynamiczny rozwój nauk medycznych i przyrodniczych pociąga za sobą intensywny rozwój analityki chemicznej, w której dominującą rolę odgrywają czułe, selektywne i dokładne metody wykrywania i oznaczania różnych indywiduów w obecności przeróżnych interferentów. Gdy istotna jest szybkość przeprowadzenia analizy lub potrzeba monitorowania określonego parametru, przy niskich kosztach i bez udziału wysoko wykwalifikowanego personelu często jedynym rozwiązaniem jest zastosowanie odpowiednich sensorów chemicznych. W tym kontekście, wskazaną przez Promotorów i realizowaną przez Doktorantkę tematykę badawczą należy uznać za priorytetową gdyż wytycza nowe kierunki poszukiwania selektywnych i czułych receptorów rozpoznających aniony, w złożonych próbkach biologicznych i środowiskowych. Prace te nie tylko, że przyczyniają się do rozwoju biosensorów elektrochemicznych, ale pomagają zrozumieć oddziaływania pomiędzy metalokompleksami peptydowymi i biologicznie aktywnymi cząsteczkami, a tym samym prowadzą do lepszej diagnostyki pacjentów i opracowania nowych skutecznych leków. Należy wspomnieć, że liczba znanych i scharakteryzowanych receptorów anionów jest znacznie mniejsza niż receptorów kationów, gdyż w przypadku tych pierwszych obserwuje się dużo większą różnorodność kształtu, rozmiaru i ładunku.

#### *Osiągnięcia pracy*

Podsumowując osiągnięcia mgr inż. Aleksandry M. Tobolskiej muszę zauważyć, że celem mojej recenzji nie jest ocena Jej dorobku naukowego, który można wyrazić liczbą opublikowanych prac, wygłoszonych komunikatów czy zrealizowanych projektów, ale przede wszystkim ocena osiągnięcia naukowego, będącego rezultatem planowanych i przeprowadzonych przez nią badań. Dlatego szczegółowej analizie poddałem zarówno wyznaczone na wstępie cele jak i wszystkie procedury ich realizacji zwieńczone publikacją bardzo dobrych artykułów naukowych. Pracę recenzenta ułatwiła mi dogłębna analiza porównawcza osiąganych rezultatów z danymi literaturowymi, której Doktorantka dokonuje na każdym etapie podejmowanych działań, i którą podsumowuje każdy z rozdziałów swojej dysertacji.

Jako osiągnięcia o charakterze nowatorskim i mającym istotne znaczenie dla rozwoju realizowanej tematyki badawczej należy uznać:

- 1) Przeprowadzenie klasyfikacji peptydów  $\beta$ -amyloidu z rodziny  $A\beta_{5-x}$  oraz charakterystyki ich kompleksów z jonami Cu(II) i Ni(II), w efekcie której dokonano wyboru analogu  $A\beta_{5-9}$  o sekwencji aminokwasów: Arg-His-Asp-Ser-Gly (RHDSG) jako selektywnego receptora jonów fosforanowych(V).

- 2) Wykazanie zróżnicowanych odpowiedzi prądowych dla receptora typu Ni(II)-A $\beta$ <sub>5-9</sub> w obecności nukleotydów posiadających jedno lub trzy ugrupowania fosforanowe.
- 3) Dowiedzenie, że budowa metalokompleksu peptydowego (rodzaj kationu centralnego i sekwencja aminokwasowa) determinuje zarówno mechanizm wiązania kationu metalu, właściwości strukturalne i elektrochemiczne, ale także selektywność rozpoznania anionów fosforanowych(V).
- 4) Zaprojektowanie biblioteki peptydów, na podstawie której wyselekcjonowano dwie kolejne sekwencje aminokwasów: RHGSG i RHRSG o wyższej selektywności niż sekwencja modelowa RHDSG.
- 5) Zastosowanie metalokompleksów peptydowych do rozpoznawania grup fosforanowych(V) oraz do dyskryminacji oligopeptydów His2 na podstawie analizy chemometrycznej sygnałów elektrochemicznych zarejestrowanych w roztworach ich układów binarnych i trójskładnikowych.
- 6) Dostarczenie informacji o możliwych oddziaływaniach pomiędzy związkami koordynacyjnymi jonów metali z białkami/peptydami a anionami fosforanowymi(V), co ma kapitalne znaczenie dla zrozumienia procesów patologicznych np. wywołanych przez reaktywne formy tlenu (RFT).

Równie interesujące są perspektywiczne kierunki badawcze wskazane przez Doktorantkę, to:

- 1) Dalsza optymalizacja struktury receptora, np. przez wprowadzenie większej liczby reszt argininy w sekwencji aminokwasowej peptydu, w celu poprawy selektywności rozpoznawania anionów.
- 2) Dążenie do rozróżnienia peptydów istotnych w przebiegu choroby Alzheimera, na podstawie odmiennych właściwości redoks rodziny peptydów  $\beta$ -amyloidu tworzących kompleksy z Cu(II).
- 3) Przeprowadzenie analizy aktywności biologicznej (typu nukleaza) kompleksów Ni(II) z ligandami peptydowymi z sekwencją His2 jako próby wyjaśnienia toksyczności jonów niklu.

#### *Ocena końcowa*

Analizując cel i zadania nakreślone przez Promotorów i Doktorantkę nie mam żadnych wątpliwości, że tematyka pracy jest ważna, ciekawa, wielowątkowa i stanowi oryginalne podejście zarówno koncepcyjne jak i metodyczne, a zatem spełnia wymagania tzw. „nowości naukowej”. Na uwagę zasługuje bardzo bogaty, zróżnicowany warsztat badawczy i potencjał intelektualny, które zadecydowały o twórczym rozwijaniu wielokierunkowych badań podstawowych o wyraźnym ukierunkowaniu aplikacyjnym. Opracowane prototypowe receptory molekularne na bazie metalokompleksów peptydowych stanowią nową jakość w metrologii chemicznej. Bez wątpienia, to interdyscyplinarne podejście pozwoliło opisać i zrozumieć naturę i właściwości, a w konsekwencji przebiegające mechanizmy rozpoznania molekularnego z zastosowaniem sfunkcjonalizowanych metalokompleksów peptydowych przeznaczonych docelowo do budowy selektywnych biosensorów. Słowa uznania kieruję do Doktorantki i Promotorów pracy, za wyjątkowo trafne sformułowanie tematu i celu rozprawy, jak również konsekwentną jego realizację.

#### *Uwagi i komentarze do pracy*

Wyjątkowa staranność działań Doktorantki na każdym etapie realizacji pracy przysporzyła Jej wielu sukcesów naukowych, a mnie jako recenzentowi odebrała możliwość wskazania jakichkolwiek błędów, poza jednym, który dotyczy cytowanej wartości IF: 5,346 dla czasopisma *Inorganic Chemistry*, gdyż IF wynosi 5,436, tym samym Doktorantka straciła część przynależnych jej punktów.

Z obowiązku recenzenta zgłaszam pod dyskusję tylko jedną uwagę, prosząc Doktorantkę aby w sposób merytoryczny ustosunkowała się do niej w trakcie publicznej obrony, mianowicie na stronie 7 rozprawy (Streszczenie) zamieszczono następującą informację: „Badania rozpoczęto od wyselekcjonowania cząsteczki peptydu spośród N-końcowych analogów  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ), ściśle związanych z patologia choroby Alzheimera.” Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie związków przyczynowo-skutkowych, które już na wstępie planowanych działań pozwoliły wskazać tak jednoznaczne (ściśle) kryterium selekcji cząsteczki peptydu.

Nawet bardzo wnikliwa lektura rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry M. Tobolskiej nie dostarcza absolutnie żadnych argumentów abym mógł zgłosić jakiegokolwiek zastrzeżenia merytoryczne. Wręcz przeciwnie, pozostają pod ogromnym wrażeniem jakości wykonanej pracy eksperymentalnej, szerokiej interdyscyplinarnej wiedzy Doktorantki, która umożliwiła Jej tak trafne i zrozumiałe dla czytelnika wyjaśnienie zachodzących, złożonych reakcji biochemicznych i procesów elektrodowych, wskazanie szerokiego spektrum potencjalnych zastosowań oraz koniecznych w tym celu dalszych badań, a także wyjątkowej dbałości o redakcję językową i szatę graficzną. Uważam, że przedstawione oryginalne koncepcje receptorów peptydowych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe znajdują, jeżeli już nie znalazły, wielu naśladowców w kraju i za granicą.

### Wniosek końcowy

W mojej ocenie przedłożona rozprawa doktorska zawiera istotne elementy nowości naukowej, potwierdza także szeroką interdyscyplinarną wiedzę Doktorantki w reprezentowanej dyscyplinie, a stawiane wnioski końcowe jednoznacznie dowodzą, że wszystkie zakładane cele badawcze zostały w pełni zrealizowane. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa mgr inż. Aleksandry M. Tobolskiej pt. „Projektowanie receptorów molekularnych wykorzystujących metalokompleksy peptydowe” **spełnia wszystkie wymagania odpowiednich przepisów prawnych i zwyczajowych stawianych pracom doktorskim i wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Magdaleny Tobolskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie rozprawy**, co uzasadniam wyjątkowo **wysokim poziomem merytorycznym** prezentowanych wyników badań oraz ich **ogromnym potencjałem aplikacyjnym**. Interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, bardzo bogaty, rzetelnie zinterpretowany materiał doświadczalny i osiągnięte rezultaty, których dowodem są oryginalne receptory molekularne przystosowane do selektywnej detekcji jonów fosforanowych(V) oraz publikacje naukowe, których łączny IF = 24.579, **mają wybitnie nowatorski charakter**, doskonale wpisują się w **nowe strategie rozwoju** współczesnych biosensorów elektrochemicznych i wnoszą **znaczący wkład w rozwiązanie istotnego problemu badawczego**. Co ważne, w sześciu z opublikowanych prac Doktorantka aż czterokrotnie jest autorem korespondencyjnym, wymienianym na pierwszym miejscu na liście współautorów.

Kraków, 15.02.2023 r.