

Olsztyn, 10 lutego 2026 r.

Prof. dr hab. Zbigniew Wieczorek

Emerytowany pracownik:

Katedry Fizyki i Biofizyki

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Stachurskiej - Korzeniowskiej, zatytułowanej: „*Dodecylosiarczan sodu w badaniach strukturalnych białek*”.

Zmiany struktury białek zachodzące pod wpływem dodecylosiarczanu sodu (SDS) są podstawą dla najpopularniejszej techniki laboratoryjnej stosowanej do rozdzielania białek i określania ich mas cząsteczkowych: elektroforezy w żelu poliakrylamidowym. Jednak mechanizm, za pomocą którego SDS indukuje rozwijanie białek oraz mikrostruktura kompleksów białko-SDS pozostają w dużej mierze nieznane.

Przedstawiona do recenzji rozprawa wpisuje się w poszukiwania mechanizmu, poprzez który SDS indukuje rozwijanie białek. Badania metodami eksperymentalnymi i teoretycznym, w których w ostatnim okresie szczególną rolę odgrywają metody symulacji dynamiki molekularnej pozwoliły na zaproponowanie kilku modeli zachodzenia tego procesu. Jednak w większości odnoszą się do sytuacji, z którą mamy do czynienia w przypadku wykorzystania SDS w elektroforezie, a więc przy bardzo dużym stężeniu SDS i podwyższonej temperaturze. Metody symulacji dynamiki molekularnej pokazują, że w przypadku wielu białek (oczywiście w warunkach podobnych do tych stosowanych w elektroforezie) zmiany struktury zachodzą w czasach rzędu mikrosekund. Z tego powodu trudno prowadzić badania szybkości zmian strukturalnych metodami eksperymentalnymi, czego jednak podjęła się Autorka rozprawy.

Rozprawa doktorska jest obszernym, oryginalnym opracowaniem o dość klasycznym układzie treści przypominającą typowy podział występujący w publikacjach naukowych. Część rozdziałów została podzielona na podrozdziały, a niektóre na jeszcze mniejsze części składowe. Całość opatrzona jest streszczeniem w języku angielskim i polskim, wykazem stosowanych skrótów oraz wykazem wykorzystywanych programów komputerowych i zasobów internetowych, a także wykazem publikacji, których współautorką jest Autorka rozprawy i które zawierają część prezentowanych wyników. Nie mam zastrzeżeń do formalnego układu pracy, który daje klarowny obraz treści.

Tytuł pracy dość dobrze określa zawartość rozprawy, choć w mojej ocenie ma brzemienne nazbyt ogólne. Pierwszy rozdział zatytułowany „*Wstęp*” (str. 14 do str. 32) stanowi wprowadzenie w tematykę rozprawy opartą na literaturze, jednak wybrzmiewa w nim popularno-naukowe podejście Autorki. Odbiór tego rozdziału przez czytelnika psuje stosowanie swoistego żargonu, który zamazuje odróżnienie zjawisk fizycznych, jakimi są absorpcja promieniowania elektromagnetycznego, fluorescencja i dichroizm kołowy od wielkości fizycznych charakteryzujących te zjawiska: absorbancji lub transmitancji, natężenia fluorescencji i eliptyczności. Ten żargon zlewający zjawiska z wielkościami fizycznymi jest niestety kontynuowany w całej rozprawie, choćby w podpisach osi rzędnych na wielu rysunkach: „*fluorescencja*”, a powinno być natężenie fluorescencji, czy „*CD*”, a powinna być eliptyczność. Z obowiązku recenzenta zwracam też uwagę na wynikające prawdopodobnie z tego żargonu stwierdzenie w podrozdziale „*Oddziaływanie promieniowania UV z materią*” na str. 25: „*Fala elektromagnetyczna charakteryzuje się dualizmem korpuskularno – falowym, oznacza to, że jest jednocześnie falą i strumieniem cząsteczek. ... Z drugiej strony jest to zbiór cząsteczek ...*”, które delikatnie określając jest niepoprawne. Cząsteczka, to co najmniej dwa połączone wiązaniem chemicznym atomy, a foton to cząstka fundamentalna. Na str. 25 i 26 znajdujemy podział promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu, w którym należy zmienić kolejność w podawanych zakresach długości fal lub w podawanych zakresach energii, tak aby kolejność wymienianych długości fal odpowiadała energii fotonów. I jeszcze jedna uwaga do tego podrozdziału, na str. 26 prawdopodobnie tzw. literówka spowodowała, że według Autorki energia elektronowa cząsteczki: „*wynika z energii potencjalnej interakcji elektronów z jąder*”.

Ostatnie zdanie **Wstępu** (str. 15) zarysowuje dokładniej zawartość rozprawy, w którym Autorka stwierdza, że: „*zostały opisane przeprowadzone badania układów białko–SDS oraz próba zrozumienia zachodzących w wybranych białkach [...] zmian strukturalnych pod wpływem dodecylsiarczanu sodu, z wyraźnym podziałem na zmiany struktury II- i III-rzędowej*”.

W rozdziale drugim na czternastu stronach Autorka prezentuje wykorzystane materiały i zastosowane metody eksperymentalne i obliczeniowe do analizy widm dichroizmu kołowego oraz krzywych prezentujących zmiany wielkości fizycznych uzyskanych z eksperymentów wykonanych metodą zatrzymanego przepływu. W ocenie recenzenta dobór metod badawczych, które wykorzystwała Autorka jest właściwy. Na szczególne podkreślenie zasługuje włączenie do badań prób śledzenia szybkości zachodzenia procesów zmian struktury białek przy użyciu aparatury o lepszych parametrach niż wcześniej stosowana w tego typu badaniach przez innych

autorów. Rozdział ten czyta się już znacznie lepiej niż poprzedni, choć Autorka nie ustrzegła się błędów w dwóch miejscach: na str. 37 czytamy, że spektrofotometr UV-2401-PC Shimadzu jest wyposażony w „dwie lampy generujące promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane liniowo”, i dalej na str. 38, że spektrofluorymetr Cary Eclipse firmy Agilent Technologies jest wyposażony w: „lampę ksenonową emitującą promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane liniowo”. Lampy w wymienionych urządzeniach nie emitują promieniowania spolaryzowanego liniowo. Należy też wspomnieć o braku informacji w tym rozdziale dotyczącej poprawek na filtr wewnętrzny w pomiarach natężenia fluorescencji, co jednak znalazłem w publikacji, która zawiera część przedstawianych w rozprawie wyników badań.

Najbardziej obszerny rozdział trzeci, zatytułowany „*Badania własne*”, zajmuje aż 126 stron rozprawy. Ma charakter bardzo szczegółowego raportu prezentującego krok po kroku kolejne etapy przeprowadzonych przez Autorkę eksperymentów i analizę ich wyników opatrzonych interpretacją oraz w części dyskusją w odniesieniu do literatury naukowej dotyczących wpływu dodecylosiarczanu sodu (SDS) na strukturę II- i III-rzędową pięciu białek: α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu pochodzących z trzustki bydlęcej, albuminy surowicy bydlęcej, lizozymu z białka jaja kurzego oraz α -laktoalbuminy z mleka krowiego. Co istotne dobór badanych białek nie wydaje się przypadkowy, patrząc zarówno na masy cząsteczkowe, jak i udział w strukturze natywnej mostków disiarczkowych, α -helis i β -kardexów.

Zasadniczo rozdział ten składa się z dwóch części. W części pierwszej (40 stron manuskryptu, 9 tabel, 23 rysunki) Autorka przedstawia wyniki wpływu dodecylosiarczanu sodu na strukturę II- i III-rzędową α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu. Wyniki tych badań zostały już opublikowane w trzech artykułach naukowych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, w renomowanym czasopiśmie *ACS Omega* o wysokim wskaźniku wpływu IF: 4,3. Pokazuje to, że uzyskane wyniki przeszły pozytywnie weryfikację recenzentów międzynarodowych. Część druga (85 stron manuskryptu, 22 tabele, 49 rysunków) zawiera bardzo szczegółowy raport z badań wpływu SDS na strukturę II- i III-rzędową albuminy, lizozymu i α -laktoalbuminy, rozbudowane dodatkowo o wpływ siły jonowej roztworu. Jak sama Autorka stwierdza, została wykorzystana wypracowana wcześniej ścieżka badawcza w odniesieniu do dwóch białek: α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu, która się sprawdziła i przyniosła publikacje. Wyniki poszczególnych eksperymentów i ich omówienie kończą się krótkimi podsumowaniami.

Sposób prezentowania wyników, ich opis i dyskusja są na dobrym poziomie, chociaż mam kilka uwag, które nie umniejszają merytorycznej wartości treści rozdziału „*Badania własne*”,

ale z obowiązku recenzenta powinienem je wskazać. Nie przywiązując większej wagi do kilku „literówek”, które można znaleźć w tekście, przedstawiam poniższe uwagi.

1. Na stronie 64 Autorka wprowadza swoistego rodzaju definicję: „*tzw. relatywne (różnicowe) krzywe postępu reakcji, które uzyskuje się poprzez odjęcie od krzywej białko-SDS krzywej białko bufor*”. Uważam, że to bardzo niefortunne określenie, dodatkowo sugerujące, że „relatywne” to to samo co „różnicowe”. Słownik języka polskiego PWN definiuje „relatywny” – uzależniony od czegoś, wynikający z porównania, a jako synonim podaje „względny”. Tymczasem definicja Autorki mówi, że są to krzywe przedstawiające różnicę wartości mierzonej wielkości fizycznej uzyskanej w układzie białko – SDS i białko – bufor. W tekście rozprawy i podpisach pod rysunkami „relatywne krzywe” pojawia się aż 47 razy. W mojej ocenie lepszym określeniem byłoby „skorygowane” zamiast „relatywne”, bo przecież odejmując wartości mierzonej wielkości uzyskane dla układu białko - bufor od wartości tej samej wielkości fizycznej uzyskanej dla układu zawierającego białko, bufor i SDS korygujemy widmo.

2. Na stronie 70. Autorka stwierdza, że: „model czteroetapowy znacznie lepiej opisuje proces”. I tu ogólna uwaga, że dopasowanie do krzywej każdego modelu, który składałby się z więcej niż jednej krzywej eksponencjalnej zawsze będzie lepsze. Czym większa liczba założonych etapów reakcji tym dopasowanie będzie lepsze. Nasuwa się pytanie, na które nie znalazłem odpowiedzi w rozprawie, jakie inne przesłanki przemawiają akurat za modelem czteroetapowym, poza jakością dopasowania do danych eksperymentalnych.

3. Na rysunkach 25 i 26 na osi odciętych znajduje się długość fali w nm w zakresie 0 -200 nm, a na tej osi powinien być czas, skoro ma przedstawiać krzywą postępu reakcji.

4. W Polsce stosujemy przecinek w systemie dziesiętnym, a na rysunkach 27, 31, 32, 33, 38 i w tabeli 9 znajdują się kropki.

5. Na stronie 87. Autorka podsumowuje wyniki badań fluorescencji α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu w obecności różnych stężeń SDS. Zgadza się ze stwierdzeniem zawartym w tym podsumowaniu, ale bardzo proszę o odniesienie się do faktu, że ponieważ dodatek SDS zmienia strukturę II- i III-rzędową białka, to pojawia się możliwość, aby np. niektóre tryptofany, które wcześniej nie miały kontaktu z rozpuszczalnikiem uzyskały taki kontakt lub kontakt z SDS. Wiadomo bowiem, że właściwości fluorescencyjne zależą silnie od mikrootoczenia chromoforu.

6. Przyglądając się widmom przedstawionym w tej części rozprawy, a szczególnie na rysunkach 41, 43, 45, 50, 54, 59, na których widoczne są bardzo silne zmiany w widmach dichroizmu kołowego mieszanin zawierających białka z SDS już przy najmniejszym badanym

stężeniu SDS w porównaniu do uzyskanych dla roztworów samego białka nasuwa się pytanie, czy nie należało wykonać pomiarów przy jeszcze mniejszych stężeniach SDS, aby sprawdzić te radykalne zmiany w widmach CD.

7. Bez wątpienia interesującym zagadnieniem jest wpływ siły jonowej roztworu na badane zmiany strukturalne. Z obowiązku recenzenta zwracam jednak uwagę, że bufor fosforanowy o stężeniu 10 mM i $\text{pH} = 7$ nie ma siły jonowej zero. Stąd wszystkie dane w tabelach i wykresach w tych podrozdziałach nie pokazują wartości siły jonowej, tylko wartości jej wzrostu względem roztworu buforowego w wyniku dodania chlorku sodu. Oczywiście to nie umniejsza wartości uzyskanych rezultatów, ale konieczne będzie zmiana zapisów dotyczących wartości siły jonowej przy publikacji rezultatów prezentowanych w tej części rozprawy. W tym miejscu nasuwa się pytanie o dalsze losy nieopublikowanych wyników prezentowanych w rozprawie.

W rozdziałach 4 i 5 Autorka zgrabnie podsumowuje wyniki i pokazuje dalsze perspektywy badań. Rozdział 6. stanowiący „Dodatek” uszczegóławia graficznie część danych prezentowanych we wcześniejszych rozdziałach. Całość kończy zestawienie literatury, do której Autorka odwołuje się w rozprawie.

Stwierdzam, że moje wcześniejsze uwagi oraz wskazane braki i niedociągnięcia nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy. Bezsporne są osiągnięcia Autorki ocenianej rozprawy, do których przede wszystkim zaliczam: jednoznaczne wskazanie czynników, od których zależą obserwowane zmiany w strukturze II- i III-rzędowej; pokazanie różnych „ścieżek” ich zachodzenia; pokazanie, że zmiany w strukturze zachodzą już dla małych stężeń SDS – znacznie poniżej krytycznego stężenia micelizacji; pokazanie, że zmiany zachodzące w strukturze II- i III-rzędowej nie zawsze są ze sobą ściśle skorelowane; uchwycenie kinetyki zachodzenia tych zmian w części badanych układów. Choć mimo dokładniejszej aparatury, w przypadku niektórych białek zmiany strukturalne są na tyle szybkie, że nadal nie można śledzić tego procesu w funkcji czasu, ponieważ zachodzą w czasie krótszym niż czas martwy układu pomiarowego.

Należy również zwrócić uwagę, że w celu realizacji badań objętych ocenianą rozprawą, Autorka musiała opanować bardzo bogaty warsztat badawczy. Szczególnie ważną rolę odgrywa tu właściwa interpretacja uzyskanych danych spektroskopowych. Jestem pełen podziwu dla opanowania w mojej ocenie trudnej metody badawczej, jaką jest metoda zatrzymanego przepływu.

Bardzo ważnym jest także fakt, że publikowanie wyników badań w dobrych czasopismach w trakcie realizacji ocenianej rozprawy przyniosło Autorce istotny dorobek

naukowy, wsparty dodatkowo wcześniejszą publikacją z 2019 roku w *The Journal of Physical Chemistry B*. We wszystkich publikacjach Autorka rozprawy jest pierwszym autorem.

Podsumowując, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką prof. dr. hab. Jana Antosiewicza stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka rozprawy spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora. Wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ukipew Wilewonek