



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA
W KRAKOWIE



Prof. dr hab. Květoslava Burda

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
30-059 Kraków, ul. Reymonta 19

Kraków, 28.02.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Aleksandry Radko

Pani mgr Aleksandra Radko wykonała pracę doktorską zatytułowaną „*Właściwości fizyczne i samoorganizacja kompleksów DNA-surfaktant kationowy: wpływ rodzaju DNA oraz struktury surfaktantu.*” w Zakładzie Inżynierii Nowych Materiałów w Instytucie Fizyki na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki Marzec. Promotorem pomocniczym był dr Robert Ekiert z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Badania zawarte w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane przez WFAiIS UJ w ramach dotacji na badania naukowe młodych naukowców przyznanych p. A. Radko w 2017, 2019 i 2020 roku.

Celem pracy p. Aleksandry Radko było przeprowadzenie systematycznych badań wybranych kompleksów tworzonych przez kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) i surfaktanty kationowe w celu znalezienia zależności pomiędzy fizyko-chemicznymi własnościami wytworzonych kompleksów a ich chemiczną i przestrzenną strukturą zarówno dla próbek objętościowych, jak i cienkich warstw. Związki tego typu są w kręgu zainteresowań wielu interdyscyplinarnych grup badawczych ze względu na ich potencjalnie szerokie możliwości aplikacyjne. Kompleksy DNA-surfaktant znajdują szerokie zastosowanie od optoelektroniki po biomedycynę. Układy te charakteryzuje ukierunkowane przewodnictwo wzdłuż szkieletu DNA, możliwość wzbudzenia falami z szerokiego zakresu światła widzialnego, czy też szczególne własności dielektryczne. Służą do dyspersji barwników jednocześnie minimalizując wygaszanie fluorescencji. Są wykorzystywane do wytwarzania matryc dla prowadzenia reakcji katalitycznych, a także jako nośniki genów i leków. Tak duża popularność kompleksów DNA-surfaktant wynika dodatkowo z dużej ich stabilności, hydrofobowości w przeciwieństwie do hydrofilnego DNA, a więc gęstszego upakowania i łatwości samoorganizacji (od uporządkowanych struktur lamelarnych, poprzez heksagonalne i sześciennie po nieuporządkowane fazy izotropowe). Kompleksy DNA-surfaktant powstają w wyniku oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy ujemnie naładowaną grupą fosforanową DNA i dodatnio naładowanym azotem surfaktantu w

przypadku związków badanych w ramach doktoratu. Tak powstałe polielektrolity są ponadto stabilizowane oddziaływaniami bliskiego zasięgu i możliwymi mostkami wodorowymi. Mogą tworzyć warstwy objętościowe, liotropowe oraz termotropowe ciekłe kryształy i hydrożele. Hydrofobowość ich ułatwia także wytwarzanie cienkich warstw, ale problemem jest brak powtarzalności uzyskiwanych warstw, ich morfologii i grubości, kluczowych dla zastosowań w elektronice organicznej. Intensywne badania, zarówno eksperymentalne jak i teoretyczne, kompleksów DNA-surfaktant pozwoliły stwierdzić, że najlepszą stabilność wykazują polielektrolity utworzone z surfaktantów, których alifatyczny łańcuch zawiera 16 atomów węgla. Jednakże wciąż nie są znane mechanizmy odpowiedzialne za proces kompleksowania i jego wpływ na strukturę DNA w powstałych układach. Jej zmienność została udokumentowana, ale nie ma jednoznaczności co do kierunku tych zmian i jakie czynniki są odpowiedzialne za obserwowane różnice. W literaturze brakuje informacji, które pozwoliłyby na porównanie wyników otrzymywanych przez różne grupy badawcze.

Pani Aleksandra Radko skoncentrowała się na badaniach polielektrolitów zawierających jeden z trzech wybranych surfaktantów kationowych: chlorek cetyltrimetyloamonowy (CTMA), chlorek benzyldimetyloheksaamonowy (BAC) i chlorek heksadecylopirydynowy (HDP), które spełniają powyższy warunek, ale różnią się grupą funkcyjną przy azocie. Własności kompleksów były badane także w zależności od rodzaju DNA, od rozkładu długości nici i ich konformacji (krótkie i długie liniowe DNA oraz plazmidowe DNA). Przeprowadzone przy zastosowaniu szeregu komplementarnych metod badania miały pozwolić odpowiedzieć na pytanie, czy „*właściwości kompleksu DNA-surfaktant kationowy zależą zarówno od rodzaju DNA, jak i struktury surfaktantu*”.

Doktorantka badała osiem różnych kompleksów DNA-surfaktant kationowy w postaci próbek objętościowych i cienkich warstw. W przypadku próbek objętościowych wykorzystowała spektroskopię w podczerwieni (FTIR) do potwierdzenia utworzenia się w/w kompleksów, dyfrakcję rentgenowską XRD (w tym niskokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich - SAXS) do wyznaczenia parametrów ich komórek elementarnych i spektroskopię dielektryczną do charakterystyki ich własności elektrycznych oraz procesów relaksacyjnych w nich występujących. Ponadto przetestowała szereg znanych metod wykorzystywanych do wytwarzania cienkich warstw kompleksów DNA-surfaktant, spośród których najlepszą powtarzalność uzyskiwała stosując metodę Langmuira-Blodgett (LB). Przeanalizowała zachowanie się monowarstw na granicy faz ciec-z-gaz i zoptymalizowała warunki wynoszenia warstw na podłoże stałe. Utworzone cienkie warstwy obrazowała za pomocą mikroskopu sił atomowych, a analizę struktur przez nie tworzonych przeprowadziła stosując szybką transformatę Fouriera (FFT)

Rozprawa doktorska p. A Radko została napisana w języku polskim. Liczy 146 stron wliczając „*Dodatek - Historia badań DNA*”. Poza stroną tytułową, wymaganymi oświadczeniami, podziękowaniami, spisem treści, spisem skrótów pojawiających się w pracy, streszczeniem w języku polskim i angielskim opatrzonego słowami kluczowymi, zawiera informację o publikacjach, w których częściowo zostały już opublikowane wyniki rozprawy oraz konferencjach, na których były one prezentowane. Następnie jest krótki wstęp i przedstawienie motywacji oraz celu pracy. Pozostała część pracy została podzielona na część teoretyczną, opisującą budowę i struktury DNA, surfaktanty oraz ich kompleksy, i doświadczalną, na którą składa się pięć rozdziałów z podrozdziałami. Pierwszy z nich zawiera opis stosowanych metod badawczych, drugi opis metod wynoszenia cienkich warstw, trzeci informacje o materiale badawczym i jego przygotowaniu, czwarty dotyczy badań właściwości próbek objętościowych kompleksów, a piąty badań właściwości cienkich warstw kompleksów. Następnie jest „*Podsumowanie i wnioski*”, po których Doktorantka zamieściła „*Bibliografię*”, na którą składa się 108 pozycji literaturowych, „*Spis tabel*” (łącznie 30) i „*Spis ilustracji wykorzystanych w pracy*” (łącznie 77).

Pani A. Radko podjęła próby pozyskania DNA o dobrze określonej długości łańcuchów i konformacji stosując szereg metod biochemicznych, jak: trawienie enzymatyczne, elektroforeza czy chromatografia jonowymienna. Niestety, zarówno kupny materiał DNA, jak i ten samodzielnie pozyskany nie był materiałem jednorodnym. Ostatecznie eksperymenty były prowadzone na DNA pochodzącym z nasienia łososia oznaczonym jako dsDNA (długie) o rozkładzie długości łańcucha od 25 do 10000 pz (ważona średnia masa cząsteczkowa, wśmcz: ok. 6 500 pz) i jako dsDNA (krótkie) zawierającym od 5 do 240 pz (wśmcz: ok. 117 pz) oraz frakcji DNA o krótkich łańcuchach porównywalnych do tych komercyjnie dostarczanych dsDNA(krótkie), pozyskanych w wyniku oczyszczania dsDNA długiego metodą chromatograficzną (nazwanej dsDNA(chrom)), zawierającej od 6 do 190 pz. Plazmidowe DNA (pDNA) zawierające ok. 4704 pz pochodziło z bakterii *Escherichia coli* wyhodowanych w laboratorium. Zawierało mieszaninę aż trzech konformacji: liniowej, kołowej i superskręconej (dominującej). Ostatecznie Doktorantka przebadła własności kompleksów wszystkich powyższych struktur DNA z CTMA oraz dsDNA(krótkie) i pDNA z BAC oraz HDP, których powstawanie potwierdziła eksperymentalnie. W przypadku liniowych form DNA zaobserwowała zmianę ich struktury w kompleksach z B-DNA na A-DNA, a więc nieco szerszą (o ok. 0.2 nm) i krótszą (o ok. 0.1 nm) formę oraz mniejsze uporządkowanie łańcuchów surfaktantów. Podobny efekt wystąpił dla DNA plazmidowego w kompleksach, który występował w formach A- i Z-DNA przed reakcją, a po reakcji z surfaktantem wyłącznie A-pDNA. Doktorantka wyznaczyła parametry komórki elementarnej dla kompleksów dsDNA(krótkie) - CTMA/BAC/HDP, które są zbliżone, ale tylko kompleks z CTMA posiadał strukturę heksagonalną, podczas gdy pozostałe wykazywały zniekształconą fazę heksagonalną z domieszką heksagonalnej. Oszacowała także szerokość w/w kompleksów, spośród których ten z CTMA wykazuje najmniejszą szerokość, a z BAC największą, zgodnie z oczekiwaniami. Dyfraktogramy rentgenowskie wykazały, że próbki dsDNA(krótkie) - surfaktant posiadały zanieczyszczenia niezwiązanymi surfaktantami, których nie udało się całkowicie usunąć.

Pani A. Radko zaobserwowała, że w przypadku badanych przez nią kompleksów DNA ich przewodność właściwa malała wraz ze wzrostem długości łańcuchów DNA. Największą przewodność właściwą wykazał kompleks dsDNA(krótkie) - CTMA. Porównując wpływ surfaktantów na przewodność właściwą kompleksów zawierających dsDNA(krótkie) i pDNA, te z HDP wykazywały największą, a z BAC najmniejszą przewodność. Doktorantka sugeruje, że zarejestrowane w pomiarach dielektrycznych procesy relaksacyjne dla kompleksów są wynikiem oscylacji łańcuchów surfaktantów ze względu na przesunięcie częstotliwości relaksacji w kierunku niższych wartości w porównaniu do relaksacji rejestrowanych w r-rach DNA. W przypadku cienkich warstw osadzanych na silnie hydrofilowym podłożu miki spontaniczna samoorganizacja kompleksów DNA-surfaktant prowadziła do tworzenia się rozgałęzionych podłużnych struktur w kierunku wynoszenia warstw. Dla kompleksów zawierających plazmidowe DNA efekt ten obserwowany był już od najniższego zastosowanego ciśnienia powierzchniowego (5 mN/m), a dla zawierających liniowe DNA przy ciśnieniu 10-20 mN/m i prędkości wynoszenia 5 mm/min. Doktorantka nie zaobserwowała podobnych efektów dla podłoża krzemowego, znacznie mniej hydrofilowego w porównaniu z miką, na którym grubość warstw była mniejsza (ok. 2 nm) niż tych tworzonych na micy (ok. 3.5 nm). Nie stwierdziła wpływu DNA na zmiany kształtu izotermy w kompleksach z badanymi surfaktantami kationowymi ani ciśnienia kolapsu monowarstwy. Jednakże zarejestrowała wzrost powierzchni przypadającej na jedną molekułę, a więc zmianę położenia izotermy, wraz ze wzrostem długości łańcucha DNA. Co ciekawe, w badanych kompleksach nie zaobserwowała istotnych różnic w energii powierzchniowej cienkiej warstwy dla zastosowanych surfaktantów.

Znaczna część wyników uzyskanych przez p. A Radko została zawarta w trzech artykułach opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, których łączny *impact factor* wynosi ponad 12.5. W dwóch z nich jest pierwszym autorem.

Rozprawa jest zredagowana starannie, choć Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów, np.: wartości przewodności elektrycznej właściwej dla czystych surfaktantów podane w Tab. 17 i w późniejszych tabelkach nie zgadzają się z tymi, które można odczytać z rysunku 48, schemat określania kąta zwilżania θ przedstawiony na rys. 19 wymagałby poprawy. Nie mają one jednak większego znaczenia, jeśli chodzi o moją pozytywną ocenę pracy. Natomiast mam kilka pytań, na które chciałabym usłyszeć odpowiedź:

- 1) Brakuje informacji o stężeniu substratów w końcowym roztworze dla przeprowadzonych reakcji syntezy poszczególnych kompleksów DNA-surfaktant;
- 2) Jak obecność jonów Cl^- (ich stężenie) może wpływać na powstawanie badanych kompleksów DNA-surfaktant kationowy?
- 3) Jak wytłumaczyć ponad dwu-/trzy-krotnie niższą wartość parametru rozkładu czasów relaksacji uzyskaną dla kompleksu pDNA-BAC w porównaniu do pozostałych kompleksów?
- 4) Czy pozostałości niewyflukowanych surfaktantów w próbkach badanych kompleksów mogą wpływać na uzyskane wyniki?
- 5) W jakim kierunku należałoby zmodyfikować metodę wytwarzania warstw DNA-surfaktant kationowy, by grubość wytwarzanych warstw była na tyle duża, aby móc przeprowadzić badania przewodnictwa warstw? Jakie inne metody można byłoby zastosować w celu uzyskania informacji o własnościach elektrycznych/przewodzących cienkich warstw?

Bez wątpienia p. Aleksandra Radko wykazała się wiedzą i umiejętnościami w prowadzeniu badań o charakterze interdyscyplinarnym. Uzyskane przez nią wyniki stanowią istotny wkład do lepszego poznania własności fizyko-chemicznych kompleksów DNA-surfaktant kationowy. Wykazała, że w przypadku próbek objętościowych zależą one od struktury surfaktantów i DNA oraz długości nici DNA, podczas gdy samoorganizacja cienkich warstw powstałych z tych kompleksów zależy wyłącznie od struktury cząsteczki DNA. Tego typu systematyczne badania kompleksów DNA-surfaktant kationowy są niezwykle ważne dla projektowania układów, mających szerokie zastosowanie w nanotechnologiach dla potrzeb energetyki, elektroniki czy bio-nanomedycyny.

Uważam, że przedstawiona praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2021 r. poz/ 478 z późn. zm.) i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Aleksandry Radko do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.


Prof. dr hab. Květoslava Burda