



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 9 września 2022 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Karola Kubata
pt. „Zachowanie śladowej wody związanej w układach farmaceutycznych
i żywych organizmach anhydrobiotycznych”**

Woda, nazywana czasami „cząsteczką życia”, stanowi nie tylko znaczącą frakcję objętościową organizmów żywych na Ziemi, ale również wpływa na funkcjonalność pozostałych biomolekuł, włączając kwasy nukleinowe, białka oraz lipidy, poprzez specyficzne oddziaływania wpływające na ich konfigurację oraz zdolność do formowania struktur zorganizowanych. Pomimo powszechnej zgody środowiska naukowego w tym zakresie oraz wieloletnich badań okazuje się, iż wiele mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością wody w układach naturalnych pozostaje wciąż w obszarze aktualnych wyzwań poznawczych. Wśród tych zagadnień pojawiają się również problemy związane z wiązaniem śladowych ilości wody, na przykład przez organizmy anhydrobiotycznych, ale również przez układy syntetyczne istotne z fizjologicznego punktu widzenia, do których należą

między innymi preparaty farmaceutyczne. Właśnie tym zagadnieniom poświęcony został projekt doktorski oraz rozprawa pana mgr. Karola Kubata. W świetle powyższych tez postrzegam analizowaną pracę doktorską nie tylko jako wysoce interesującą w aspekcie poznawczym, ale również bardzo ważną w kategoriach aplikacyjności, między innymi w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kolektywnym kierunkiem pana prof. dr. hab. Huberta Harańczyka oraz pani dr hab. Anny Krupy z Wydziału Farmacji *Collegium Medicum* UJ. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 109 stronach standardowego maszynopisu, według standardowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Jeszcze przed spisem treści zamieszczone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim, czyniąc zadość odpowiednim regulacjom prawnym, oraz sekcja nazwana „Dorobek naukowy Autora”, zawierająca spis publikacji, listę prezentacji konferencyjnych oraz zestawienie projektów badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych, realizowanych ze współudziałem Doktoranta. Bezpośrednio po spisie treści zamieszczone zostały dodatkowo, na trzech stronach, „Spis symboli” oraz „Spis skrótów” bardzo pomocne w lekturze treści zamieszczonych w dalszej części rozprawy. Jej merytoryczną zawartość otwiera sekcja zatytułowana „Wprowadzenie”. Treści zamieszczone w jej ramach sygnalizują podejmowaną tematykę, uzasadniają dobór technik badawczych oraz przedstawiają czytelnikowi układ rozprawy. W ramach rozdziału I pt. „Wstęp”, w trzech kolejnych podrozdziałach Autor rozprawy zamieszcza charakterystykę dotyczącą struktury i właściwości wody (1), prezentuje szczegółowo badane układy farmaceutyczne, stałe rozproszenia z tadalafilem bądź z bozentanem (2) oraz charakteryzuje badany organizm anhydrobiotyczny jakim był porost strzępkowy *Niebla tigrina* pozyskany z pustyni Atacama w Chile. Rozdział II. pt. „Teoria” przybliżający czytelnikowi zjawiska fizyczne wykorzystywane w prowadzonych badaniach oraz przedstawiający ich opis formalny zredagowany został, w moim odczuciu, w sposób bardzo elegancki i precyzyjny, wzmacniając przekonanie o solidnych fundamentach metodologicznych

wykonywanych w ramach projektu doktorskiego badań. Szczegółowy opis stosowanych procedur eksperymentalnych oraz parametrów pomiarowych w badaniach instrumentalnych przedstawione zostały w ramach rozdziału III. pt. „Materiały i metody”. W tym miejscu swojej analizy chciałbym zwrócić uwagę na dobór technik badawczych umożliwiających uzyskiwanie komplementarnych informacji dotyczących procesu oraz mechanizmów molekularnych wiązania śladowych ilości wody przez matryce stałe. Były to, między innymi, grawimetria oraz technika $^1\text{H-NMR}$, w ramach której prowadzone były pomiary w domenach czasu oraz częstotliwości. Najważniejszym rozdziałem rozprawy, stanowiącym o jej wysokiej wartości poznawczej jest, w moim odczuciu rozdział IV pt. „Wyniki”. Jego układ odpowiada poszczególnym zadaniom badawczym realizowanym w ramach projektu doktorskiego. Dla dwóch badanych układów farmaceutycznych i dla plechy organizmu anhydrobiotycznego były to pomiary tras hydratacyjnych wraz z analizą ich kinetyki w ramach przyjętych opisów formalnych (izoterm sorpcji) oraz pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego. Wyniki tych ostatnich stanowiły źródło informacji nie tylko o maksymalnych poziomach uwodnienia badanych układów mikroheterogennych, ale również o dynamice molekularnej związanych cząsteczek wody, wskazując na różne frakcje cząsteczek H_2O odpowiadające różnym mechanizmom wiązania oraz mikro-kompartmentom. Uzyskane wyniki poddane zostały wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału V. pt. „Dyskusja”, zaś wnioski wypływające z tej dyskusji zestawione zostały w ramach rozdziału VI. pt. „Wnioski”. Rozprawę zamykają spisy rysunków i tabel oraz zestawienie pozycji cytowanego piśmiennictwa w ramach rozdziału pt. „Bibliografia”. Moim zdaniem, rozprawa doktorska pana mgr. Karola Kubata zredagowana została z dużą starannością o precyzję sformułowań, poprawność językową oraz klarowność, zarówno tekstu jak i grafik. W związku z tym, nie przedstawiam sugestii, które mogłyby wpłynąć na poprawę poziomu rozprawy w tym zakresie. Może jedynie jednostki na osi rzędnych na Rysunku IV.29: sugeruję [s] w miejsce [sek.].

W zupełności zgadzam się z wnioskami z przeprowadzonych badań, wyartykułowanymi przez Doktoranta w ramach rozdziału VI. Za szczególnie nośne, w perspektywie poznawczej, postrzegam te wskazujące na bardzo zbliżone, a w zasadzie niemalże identyczne mechanizmy wiązania wody w syntetycznych układach modelowych oraz w organizmie anhydrobiotycznym. Wskazuje to, między innymi, na wyjątkową skuteczność organizmów żywych w optymalizacji na drodze ewolucji biologicznej wykorzystania mechanizmów fizycznych na poziomie molekularnym w celu przeżycia w skrajnie niesprzyjającym środowisku. Równie ważną kategorią wniosków są te dotyczące uwodnienia rozproszonych stałych dwóch badanych substancji o znaczeniu farmakologicznym oraz doboru matryc polimerowych. Moim zdaniem, wyniki te przyczynić się mogą do opracowywania formuły farmakologicznej leków wpływających na zwiększenie ich dostępności oraz aktywności biologicznej.

Rozprawa doktorska pana mgr. Karola Kubata, jako opracowanie niezwykle obszerne oraz wartościowe, otwiera również wiele wątków i pytań. Poniżej pozwolę sobie sformułować niektóre z nich.

1. Wysoce interesującą wydaje mi się obserwacja wynikająca z analizy procesów hydratacji plechy *Niebla tigrina* przedstawianych w ramach Rysunku, IV.23 (str. 83). Wynika z niej dwoisty charakter zależności hydratacyjnej amplitudy sygnału pochodzącego od protonów mobilnych wyrażonego w jednostkach sygnału od protonów związanych. Poniżej pewnego, progowego poziomu uwodnienia zależność ta najlepiej opisywana jest funkcją wymierną, zaś powyżej liniową. Czy możliwe jest, iż taka zmiana charakteru opisu hydratacji wskazuje na wiązanie cząsteczek wody bezpośrednio z powierzchnią uformowaną przez odwodnione biomolekuły, zaś druga z formowaniem fazy objętościowej cieczy?

2. Ciekaw jestem jakie mogą być przyczyny faktu, iż w pomiarach hydratacji z fazy gazowej udało się wyodrębnić nawet 4 frakcje wody o różnym stopniu związania, co nie było możliwe w oparciu a analizy przeprowadzone z zastosowaniem techniki NMR?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Karol Kubat przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach zaprojektowanych w oparciu na jasne założenia metodologiczne oraz przeprowadzonych z ogromną precyzją pomiarów, z zastosowaniem zaawansowanych technik badawczych. Badania te wymagały wiedzy i umiejętności praktycznych w zakresie preparatyki biochemicznej oraz pomiarów NMR w domenach częstotliwości i czasu. Część wyników uzyskanych w ramach realizacji projektu doktorskiego ogłoszona została drukiem w ramach czterech oryginalnych publikacji badawczych. Ponadto, Doktorant jest współautorem innych prac i doniesień konferencyjnych prezentujących wyniki realizacji projektów, w ramach których kształtował On i doskonalił swój warsztat badawczy.

Moim zdaniem, przedstawiona przez mgr. Karola Kubata rozprawa doktorska zawiera rozwiązania aktualnych, ważnych i interesujących problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w art. 187. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r., poz. 478 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Karola Kubata do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

