



Kraków, 21 lipiec 2023

Dr hab. Władysław Węglarz, profesor instytutu
Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
W Krakowie

Recenzja pracy na stopień doktora nauk fizycznych, mgr Agaty Bogdał, zatytułowanej
„Klasyfikacja resztkowej wody związanej w rehydratyzowanych liofilizatach fosfolipidów
DPPC, POPC i DOPC”, wykonanej pod opieką promotora prof. dr hab. Huberta Harańczyka

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej było zbadanie wpływu procesu rehydratacji na zachowanie liofilizatów wielowarstwowych liposomów utworzonych z trzech różnych fosfolipidów – DPPC, POPC oraz DOPC. Do badań tych Doktorantka wykorzystwała techniki kinetyki hydratacji, relaksometrii i spektroskopii ^1H -NMR oraz spektroskopii w podczerwieni ATR-FTIR.

Badania fosfolipidów i błon biologicznych przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego mają długą historię, sięgającą wczesnego okresu rozwoju tej techniki pomiarowej (a raczej rodziny technik opartych na tym zjawisku). Spektroskopia wysokiej zdolności rozdzielczej MAS NMR na jądрах ^{31}P , ^{13}C , ^1H jak również statycznych widm ^2H NMR czy ^{31}P pozwoliła na zgromadzenie wiedzy na temat struktury, uporządkowania, przejść fazowych, etc... struktur tworzonych przez te składniki błon biologicznych, zarówno w fazie ciała stałego jak i faz ciekłokrystalicznych. Tematyka tej rozprawy dotyczy zakresu pośredniego, występującego na pograniczu tych dwu obszarów uporządkowania łańcuchów fosfolipidowych w obecności ograniczonej puli wody, dostępnej z fazy gazowej, i mieści się w nurcie badań promotora tej pracy dla wielu innych układów mikroheterogennych.

Rozprawa poprzedzona jest krótkim streszczeniem w języku polskim i angielskim, oraz spisem treści. Oprócz wprowadzenia zawiera pięć głównych części: wstęp z ogólną charakterystyką badanych układów i podstaw teoretycznych używanych metod badawczych, materiały i metody, opis wyników, dyskusję wyników oraz wnioski. Po nich zamieszczone zostały tabele z wynikami liczbowymi dopasowania sygnału FID, oraz bibliografia zawierająca 117 pozycji. Na końcu rozprawy zamieszczono zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, obejmującego listę trzech publikacji współautorskich, jednej przygotowanej do wysłania oraz sześciu prezentacji konferencyjnych (w czterech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem).

W części pierwszej, Wstępie, omówione zostały kolejno: składniki, struktura i właściwości błon biologicznych, z uwzględnieniem wpływu lipidów na ich uporządkowanie, modele błon biologicznych oraz badane fosfolipidy. Następnie zamieszczono zwięzłe opisy podstaw teoretycznych kinetyki hydratacji oraz izotermii sorpcyjnej. Dość szczegółowo natomiast



przedstawione zostały podstawy teoretyczne magnetycznego rezonansu jądrowego, w tym pomiarów MRJ w domenie czasu i częstotliwości, a także w podstawowym zakresie metody spektroskopii w podczerwieni (ATR-FTIR).

Ta część rozprawy jest starannie zredagowana i pozwala czytelnikowi dobrze zorientować się w teoretycznych podstawach zagadnień eksperymentalnych, przedstawionych w kolejnych częściach. Mam do tej części pytanie związane z podanymi przez Doktorantkę w rozdziale 1.3 temperaturami przejść fazowych pomiędzy fazą żelu a fazą ciekłokrystaliczną, mianowicie czy dla badanych fosfolipidów znane są zależności temperatur tych przejść od zawartości wody w układzie (a szerzej czy znane są diagramy fazowe temperatura/uwodnienie)? Ponieważ badania przedstawione w pracy wykonywane były w pewnym zakresie uwodnień, znajomość tej zależności wydaje się istotna przy interpretacji uzyskanych wyników. Drobniejsze uwagi dotyczą pewnych nieścisłości w tekście poświęconym podstawom magnetycznej relaksacji jądrowej, mianowicie niekompletnych wzorów 38 i 39, oraz niejasno sformułowanego zdania na stronie 49, z którego czytelnik mógłby wywnioskować że energia układu spinów jest prostopadła do wektora indukcji pola magnetycznego.

W krótkiej części drugiej, poświęconej zastosowanym materiałom i metodom badawczym zostało omówione przygotowanie próbek liofilizatów wielowarstwowych liposomów fosfolipidowych, wyznaczanie ich suchej masy oraz procedury hydratacji próbek. Ponadto dość obszernie opisano aparaturę pomiarową magnetycznego rezonansu jądrowego, mianowicie wysokopolowy spektrometr, pracujący w polu magnetycznym 7,05T i niskopolowy relaksometr o polu magnetycznym 0,7T. Podano również typowe wartości parametrów czasowych sekwencji impulsowych, zastosowanych przy wykonywaniu pomiarów. Ta część rozprawy kończy się krótkim omówieniem sposobu przeprowadzenia pomiarów widm metodą ATR-FTIR.

W części poświęconej uzyskanym wynikom, na wstępie przedstawiono metodykę analizy wyników kinetyki hydratacji, wyznaczania stopnia hydratacji na podstawie analizy pasm od wody i grupy metylowej w widmach ATR-FTIR, analizy zaników swobodnej precesji (FID) uzyskanych w niskim polu oraz analizy widm ^1H -NMR otrzymanych w polu wysokim. Według mnie te, wstępne rozdziały części poświęconej wynikom powinny zostać umieszczone w części Materiały i Metody, ponieważ dotyczą metodologii analizy danych, nie zaś samych wyników. Nie mają również przypisanej numeracji, w przeciwieństwie do innych rozdziałów rozprawy. Ponadto, wzór 69 opisujący kinetykę hydratacji jest zapisany błędnie (przedstawia funkcję malejącą z czasem zamiast rosnącej). Jest on niezgodny z poprawnym wzorem nr 2, przedstawionym w części teoretycznej rozprawy.

W kolejnych, obszernych rozdziałach zamieszczone zostały właściwe wyniki pomiarowe i analityczne uzyskane dla liofilizatów wielowarstwowych liposomów. I tak w rozdziałach 3.1, 3.2 i 3.3 znalazły się graficznie przedstawione wyniki pomiarów i analizy sygnału zaniku swobodnej precesji oraz widm ^1H NMR, odpowiednio dla: DPPC, POPC i DOPC. W przypadku DOPC zamieszczone zostały wyniki dodatkowych pomiarów widm ^1H NMR, wykonane po sześciu miesiącach inkubacji liofilizatów w temperaturze -20 stopni. Liczbowe wartości dopasowanych parametrów zaników sygnału swobodnej precesji zostały zamieszczone w formie tabelarycznej na końcu rozprawy. W następnym rozdziale 3.4 zamieszczono wyniki dotyczące kinetyki hydratacji, zaś w rozdziale 3.5 widm ATR-FTIR badanych fosfolipidów.



Poza ostatnim rozdziałem, dotyczącym ATR-FTIR, ta część rozprawy zawiera przedstawienie wyników systematycznie wykonanych pomiarów oraz ich analizy według schematu wielokrotnie stosowanego w badaniach innych, zwykle nisko-uwodnionych układów mikroheterogennych w grupie kierowanej przez promotora Doktorantki. Metodologia ta stosowana przez wiele lat, pozwoliła na uzyskanie wielu wartościowych wyników, co zostało zgrabnie przedyskutowane w szerokim kontekście tych wcześniejszych prac, w kolejnym rozdziale rozprawy i podsumowane w rozdziale ostatnim zawierającym wnioski z pracy doktorskiej.

W efekcie przeprowadzonych badań w każdym z badanych układów, Doktorantka wyodrębniła kilka frakcji pochodzących od ciała stałego lub wody o różnym stopniu ruchliwości, opisanych odpowiednio funkcjami Gaussa lub Lorentza (lub eksponenty w domenie czasu), stwierdzając istotne różnice pomiędzy poszczególnymi fosfolipidami, przejawiające się różnych udziałach tych frakcji i ich zróżnicowanym zachowaniu w funkcji uwodnienia. Ponadto, w próbce inkubowanej przez 6 miesięcy, stwierdziła obecność procesu pęcznienia występującego przy dostatecznie długim czasie hydratacji z fazy gazowej.

Przedstawione w pracy wyniki badań stanowią interesujący przyczynek do poszerzenia wiedzy dotyczącej badanych układów. Rozprawa zredagowana jest wystarczająco dokładnie aby czytelnik mógł zapoznać się zarówno ze stosowaną metodologią badawczą jak i osiągniętymi rezultatami. Tym niemniej, podczas lektury części rozprawy poświęconej wynikom wykonanych pomiarów i analiz pojawiło się kilka pytań na które chciałbym uzyskać odpowiedź podczas obrony.

1. Układy fosfolipidowe w fazie stałej jak i w fazach ciekłokrystalicznych były od wielu lat badane technikami magnetycznego rezonansu jądrowego (np. takimi jak spektroskopia MAS NMR na jądach ^{31}P , ^{13}C , ^1H oraz spektroskopia statycznych widm ^2H NMR, ^{31}P czy ^1H). W rozprawie brakuje mi szerszego odniesienia do tych badań. Prosiłbym zatem o wyjaśnienie jak wyniki uzyskane w pracy doktorskiej sytuują się w stosunku do tych wcześniejszych? Co jest w nich nowego? Czy i w jakim stopniu wyniki wcześniejszych badań fosfolipidów mogą być pomoce w interpretacji wyników uzyskanych w pracy doktorskiej? W szczególności wieloskładnikowych widm uzyskanych w wysokim polu, czy poszczególnych składowych uzyskanych z pomiarów relaksacyjnych.
2. Współczynnik kierunkowy nachylenia prostej opisującej zależność stosunku sygnału L/S w funkcji względnej zmiany masy podczas hydratacji, w większości przypadków jest stosunkowo duży dla niskich zaś mniejszy dla wyższych uwodnień (rys. 31, 41, 47, 57 i odpowiednio wzory 73-74, 76, 77-78; wartości podane we wzorach 80-81 wydają się być częściowo błędne, nie odpowiadają wykresowi na rys. 57). Jakiej wartości tego współczynnika należałoby się spodziewać biorąc pod uwagę gęstość protonową wody i łańcuchów fosfolipidowych, i przyjmując że protony wody dają wkład do sygnału L zaś protony łańcucha do sygnału G? Jakiej wartości należałoby się spodziewać w przypadku gdy, jak na rys. 57, przedstawiony jest stosunek sygnału L2/L1 (na rys. 57 jak się wydaje jest omyłkowo przedstawione odwrotnie L1/L2). Czy możliwe jest że zależność w zakresie niskich uwodnień jest opisana funkcją wymierną, a nie liniową, co niekoniecznie musiałoby oznaczać rozpuszczanie składowej stałej, ale zwiększenie mobilności łańcuchów lipidowych skutkujące



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

- zmianą sygnału z gaussowskiego na lorenzowski(eksponencjalny) i wydłużeniem czasu T_2^* (zwięźeniem linii)?
3. Przedstawione w rozdziale 3.5 widma ATR-FTIR, wykazują zmiany w funkcji uwodnienia nie tylko w pasmie odpowiadającym wodzie. Jakie informacje odnośnie ruchliwości molekuł w łańcuchach fosfolipidów można uzyskać z tych widm i czy mogą one pomóc w interpretacji wyników pomiarów relaksacyjnych i widm NMR?
 4. W pracy zostały pokazane wyniki pomiarów relaksacyjnych i widm ^1H -NMR, ale nie ma wykresów (przynajmniej przykładowych) ilustrujących teoretyczne funkcje dopasowane do danych doświadczalnych. Niektóre z wartości dopasowanych parametrów (np. w tab. 5 dla niskich uwodnień) sugerują ich dość duży rozrzut, wyraźnie większy niż zaznaczone na rys. 31 błędy dopasowania. To powoduje że trudno jest jednoznacznie określić przebieg zależności $L/G(\Delta m/m_0)$ w tym zakresie uwodnień. Czy przeprowadzono próby uzyskania lepszych dopasowań, np. z innymi wartościami początkowymi parametrów, czy wagami zależnymi od stosunku sygnału do szumu dla danych punktów pomiarowych?
 5. Wzór 84, opisujący pęcznienie jest błędnie zapisany, opisuje funkcję malejącą z czasem powinna ona być rosnąca. Wydaje się również że czas rozpoczęcia pęcznienia t_0 powinien być uwzględniony w liczniku ułamka w ostatnim członie wzoru.

Niezależnie od sformułowanych powyżej pytań i uwag, wynikających przede wszystkim z mojej nie do końca zaspokojonej ciekawości poznawczej, przedstawiona mi do recenzji praca jest interesującym przyczynkiem do określenia własności wody związanej w badanych układach rehydratyzowanych liofilizatów wielowarstwowych liposomów fosfolipidowych. Zawartość rozprawy wskazuje że Doktorantka opanowała zarówno podstawy teoretyczne badanych zjawisk i stosowanych metod jak i praktyczne umiejętności ich zastosowania.

W związku z powyższym stwierdzam że przedstawiona przez mgr Agatę Bogdał rozprawa doktorska zatytułowana „Klasyfikacja resztkowej wody związanej w rehydratyzowanych liofilizatach fosfolipidów DPPC, POPC i DOPC” spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. z 2016 r. poz 882) i wnoszę o dopuszczenie mgr Agaty Bogdał do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Władysław Węglarz