



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 13 października 2023 r.

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

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agaty Bogdał
pt. „Klasyfikacja resztkowej wody związanej w rehydratowanych liofilizatach
fosfolipidów DPPC, POPC i DOPC”**

Budowa komórkowa organizmów żywych stanowi jeden z naczelných paradygmatów charakteryzujących życie na naszej planecie, a błona komórkowa stanowi naturalną barierę oddzielającą żywe komórki od środowiska zewnętrznego. Wydaje się, iż obszar nauki związany bezpośrednio z badaniami właściwości strukturalnych oraz funkcjonalnych błon biologicznych ma już za sobą fazę charakteryzującą się najbardziej dynamiczną aktywnością. W moim odczuciu ogromną rolę w tych badaniach odegrali fizycy, którzy zaprzęgli do swoich prac cały arsenał nowoczesnych technik eksperymentalnych, począwszy od metod dyfraktometrycznych, poprzez techniki spektroskopii molekularnej aż po metody obliczeniowe i symulacje komputerową dynamiki molekularnej. Wyniki tych badań przyniosły precyzyjne informacje dotyczące struktury dwuwarstw lipidowych, ich faz

termotropowych oraz zagadnień związanych z dynamiką molekularną cząsteczek lipidów oraz innych składników biomembran. Informacje te przełożyły się bezpośrednio na wiedzę dotyczącą powiązań właściwości strukturalnych i dynamicznych oraz funkcji błon w żywych komórkach. Paradoksalnie, okres rozwoju badań w zakresie membranologii, którego jesteśmy świadkami obecnie, nie charakteryzuje się brakiem ważnych oraz interesujących problemów poznawczych, ale stanowi dobry punkt wyjścia do formułowania nowych nierozwiązanych problemów, na gruncie bogatej wiedzy z obszaru fizyki błon lipidowych oraz w oparciu o ogromny bagaż doświadczeń. W mojej ocenie, do tego typu badań wpisuje się właśnie praca doktorska pani mgr Agaty Bogdał, w ramach której postawiono sobie za cel uzyskanie cennych informacji dotyczących frakcji wody związanej w dwuwarstwach formowanych z fosfatydylocholiny, poddawanych liofilizacji. Wobec faktu, iż procedura taka stanowi częstą praktykę nie tylko w trakcie badań laboratoryjnych, ale również przy formowaniu wielu preparatów farmaceutycznych, pracę doktorską postrzegam nie tylko jako interesującą, ale również aktualną i ważną.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego, na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, pod kierunkiem prof. dr. hab. Huberta Harańczyka. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 146 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o standardowy, optymalny w moim odczuciu układ formalny. Po streszczeniach, zamieszczonych w językach polskim i angielskim, oraz spisie treści, czytelnik ma możliwość zapoznania się z krótkim wprowadzeniem, stanowiącym niejako przewodnik po dalszych stronicach rozprawy. W ramach „Wprowadzenia” sformułowane zostały również cele projektu doktorskiego, więc ich umiejscowienie w tym obszarze tezy doktorskiej wydaje się logiczne i właściwe. Osobiście, nie odczułem braku zestawienia stosowanych skrótów i oznaczeń na początku lektury pracy, chociaż spodziewam się, że oczekiwania czytelników w tym zakresie mogą być różne. Prezentacja części eksperymentalnej projektu doktorskiego w ramach rozprawy poprzedzona została „Wstępem” (rozdział 1.) zredagowanym na zasadzie przeglądu

literaturowego wprowadzającego czytelnika w zagadnienia związane bezpośrednio z błonami biologicznymi oraz ich składnikami molekularnymi, w szczególności z zagadnieniami dotyczącymi właściwości strukturalnych oraz dynamicznych dwuwarstw lipidowych. Druga grupa zagadnień, wyjątkowo obszernie i szczegółowo zaprezentowana w ramach części wstępnej, dotyczy bezpośrednio stosowanych w ramach realizacji projektu doktorskiego technik eksperymentalnych, począwszy od sposobu rejestracji oraz opisu matematycznego kinetyk hydratacji i izoterm sorpcyjnych aż do metody spektroskopii absorpcyjnej w obszarze IR (FTIR) oraz, przede wszystkim, techniki magnetycznego rezonansu jądrowego. W moim odczuciu, treści dotyczące bezpośrednio NMR zredagowane są na tyle obszernie, klarownie i precyzyjnie, iż mogą stanowić bardzo cenne źródło wiedzy nie tylko studentom ale również adeptom nauki. W ramach rozdziału 2. pt. „Materiały i metody” szczegóły dotyczące wykorzystanych odczynników, przygotowania próbek oraz zastosowanych procedur pomiarowych zaprezentowane zostały w zgodzie ze standardami opracowań naukowych, tak aby analogiczne eksperymenty powtórzone być mogły w innych laboratoriach. Najważniejszą częścią rozprawy, stanowiącą jej rdzeń a zarazem stanowiącą o wysokim poziomie naukowym, są „Wyniki” przedstawione w ramach rozdziału 3. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę odpowiadającą poszczególnym zadaniom eksperymentalnych realizowanym w ramach projektu doktorskiego. Badaniom poddawane były liofilizowane a następnie poddane procesowi rehydratacji liposomy wielowarstwowe formowane z trzech lipidów z grupy fosfatydylocholin, charakteryzujące się łańcuchami alkilowymi o różnej długości oraz o różnym stopniu nienasyconości: DPPC, POPC oraz DOPC. Wśród badanych problemów były, między innymi, analizy kinetyki hydratacji membran z fazy gazowej, pomiary sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR oraz pomiary i analizy widm ^1H -NMR w domenie częstotliwości. Uzyskane rezultaty poddane zostały dyskusji w ramach rozdziału 4. pt. „Dyskusja wyników”, zaś najważniejsze rezultaty zestawione zostały w ramach rozdziału 5. pt. „Wnioski”. W moim odczuciu, zestawienie to odpowiada w pełni przedstawionym w rozprawie wynikom badań i wpływa

z przeprowadzonej dyskusji. Rozprawę zamyka tabela prezentująca wartości dopasowania parametrów sygnału swobodnej precesji ^1H -NMR, zestawienie 117 pozycji cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału zatytułowanego „Bibliografia”, spisy ilustracji i tabel oraz zestawienie dorobku naukowego Doktorantki. W mojej ocenie, do najbardziej interesujących z poznawczego punktu widzenia rezultatów projektu doktorskiego zaliczyć można:

1. Wykazanie, na podstawie kinetyk hydratacji, istnienia co najmniej trzech grup cząsteczek wody związanych z liofilizowanymi błonami wyeksponowanymi na środowisko gazowe zawierające parę wodną
2. Charakterystyka dynamiczna frakcji cząsteczek H_2O w wielowarstwach lipidowych w oparciu o analizę sygnału zaniku swobodnej precesji ^1H -NMR
3. Wykazanie skokowych zmian strukturalnych dwuwarstw lipidowych w wielowarstwach, obserwowanych w zależności od stopnia uwodnienia.

Analizowana rozprawa doktorska jest również w mojej ocenie opracowaniem spełniającym wysokie standardy edytorskie. W oparciu o lekturę rozprawy, mógłbym zaproponować Doktorantce nieliczne modyfikacje. Oto ich krótka lista:

1. Str. 29, 2. wiersz od dołu: zamiast „we fibroblastach” raczej „w fibroblastach”
2. Str. 34., opis Rysunku 11.: zamiast fazy L_β powinno być L_β'
3. Str. 35., opis formowania błon typu BLM: roztwór lipidów zwykle nanosi się na otwór teflonowy umieszczony w fazie wodnej nie zaś w powietrzu
4. Str. 74., 1. wiersz od góry: proponuję widma „rejestrwane” zamiast „zbierane”
5. Str. 74., 2. wiersz od góry: proponuję „monokryształ ATR” zamiast „akcesorium ATR”
6. Str. 76., w tytule: proponuję „osłabionym całkowitym odbiciu” w miejsce „tłumionym całkowitym odbiciu”.

Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim znajduję rozprawę doktorską pani mgr Agaty Bogdał, porusza wiele interesujących wątków wnosząc wiele cennych informacji i rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Wielowarstwowe liposomy poddane liofilizacji poddawane były następnie uwadnianiu w temperaturze pokojowej, co oznacza, iż w przypadku struktur formowanych z DPPC badane obiekty znajdowały się w fazie usztywnionej, poniżej głównego przejścia fazowego, w odróżnieniu od POPC oraz DOPC. Czy zdaniem Doktorantki efekt ten może mieć wpływ na obserwowane charakterystyki?
2. Widma FTIR zarejestrowane w obszarze charakterystycznym dla drgań rozciągających estrowej grupy karbonylowej lipidów (Rysunek 69, str. 115, prawy panel) pokazują, moim zdaniem, bardzo interesujący efekt zmiany intensywności pasm ze szczytami w okolicach 1730 cm^{-1} oraz 1650 cm^{-1} w zależności od czasu uwadniania. Czy możliwym jest, iż efekt ten reprezentuje wiązanie cząsteczek H_2O na drodze formowania wiązania wodorowego z grupą $\text{C}=\text{O}$?
3. Interpretacja rezultatów przedstawionych przez Doktorantkę na str. 123 wprowadza bardzo interesującą koncepcję formowania kawern w strukturach błon lipidowych. Ciekaw jestem, czy istnieją jakieś bardziej bezpośrednie metody fizyczne umożliwiające potwierdzenie istnienia takich struktur? Może technika anihilacji pozytonów?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Agata Bogdał przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnych zadań badawczych realizowanych w oparciu o szereg nowoczesnych metod instrumentalnych. Doktorantka doskonalila swój warsztat naukowy w realizacji wielu projektów naukowych, których rezultatem są artykuły naukowe publikowane z Jej współautorstwem w specjalistycznych czasopismach międzynarodowych.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Agatę Bogdał rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016 r. poz. 882). W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie pani mgr Agaty Bogdał do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora, w szczególności do publicznej obrony.

W. Gruszecki



Signed by / Podpisano przez:

Wiesław Ignacy
Gruszecki
Uniwersytet Marii Curie-
Sklodowskiej

Date / Data: 2023-10-16
20:38