



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 30 września 2024 r.

Dr hab. Wojciech Henryk Grudziński, prof. UMCS
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Natalii Janiszewskiej pt.
„Charakterystyka wpływu struktury łańcuchów polimerowych na
właściwości cienkich warstw oraz ich oddziaływania z białkami”**

Obszar nauki związany ze strukturami opartymi o polimery, a w szczególności cienkie warstwy z nich utworzone jest uważnie obserwowany przez ośrodki biotechnologiczne, bioinżynieryjne czy medyczne, głównie ze względu na biomateriały, które mogą powstawać na bazie tych układów polimerycznych. W oparciu o takie materiały są tworzone innowacyjne układy dozujące leki, lepiej funkcjonujące biosensory czy też implanty różnego typu bardziej kompatybilne z ciałem człowieka. Celem badań nad immobilizacją białek jest chęć poznania m.in. procesów odpowiedzialnych za adsorpcję pojedynczych białek jak i całych układów białkowych. Zrozumienie tych zjawisk jest ważne z perspektywy projektowania materiałów biokompatybilnych, śledzenia procesów biologicznych czy konstrukcji urządzeń analitycznych lub kontrolnych opartych o oddziaływanie białek z różnymi powierzchniami, w tym przypadku cienkimi warstwami polimerycznymi.

W tym kontekście rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Janiszewskiej pozwala zajrzeć do naukowej kuchni, w której trwają prace nad bardziej precyzyjnym określeniem właściwości powierzchni utworzonych z polimerów, ich mieszanin czy kopolimerów, a w szczególności

oddziaływania tych warstw z białkami. Analiza właściwości tych struktur, stała się obiektem zainteresowań badawczych Autorki. W ramach projektu doktorskiego Pani mgr Natalia Janiszewska podjęła się zbadania wpływu struktury łańcuchów polimerowych na właściwości tworzonych cienkich warstw oraz ich oddziaływań z wybranymi białkami.

Biorąc pod uwagę powyższe, można stwierdzić, że przedłożona praca jest opracowaniem nie tylko interesującym, ale przede wszystkim bardzo ważnym. W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć przedstawionych w pracy jest wysoka, nie tylko z czysto poznawczego punktu widzenia, ale także w związku z dużym potencjałem wdrożeniowym jaki niosą ze sobą przedstawione w rozprawie wyniki.

Praca została wykonana w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej, Instytutu Fizyki im. Mariana Smoluchowskiego, na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dra hab. Kamila Awiśuka, prof. UJ - promotora rozprawy. Zakład Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej UJ to bardzo dobre laboratorium o dużej rozpoznawalności zarówno krajowej jak i międzynarodowej. W przedstawionej pracy doktorskiej znakomicie widać wykorzystanie przez Autorkę potencjału badawczego jednostki macierzystej i oferowanych przez nią zasobów związanych z zapleczem aparaturowym i doświadczeniem kadry, jak również możliwości związanych ze współpracą naukową z zaprzyjaźnionymi ośrodkami.

Rozprawa doktorska oparta jest o dwa wieloautorskie, oryginalne artykuły naukowe opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych oraz trzecią pozycję, która wg deklaracji Autorki jest przygotowana do publikacji. Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Czasopisma, w których pojawiły się artykuły znajdują się w aktualnym wykazie czasopism i są to bardzo dobre, międzynarodowe periodyki o wysokim współczynniku wpływu (IF odpowiednio: 5.4 oraz 6.3).

Doktorantka zdobywała doświadczenie badawcze biorąc udział w trzech grantach: jako kierownik dwu projektów w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w UJ, finansowany ze środków „Research Support Module” (RSM/13/UJ i RSM/53/UJ) oraz jako wykonawca (co-investigator) w grantzie SONATA profesora Kamila Awiśuka. Rezultaty, m.in. tych badań ukazały się nie tylko w publikacjach naukowych, stanowiących podstawowy wkład do recenzowanej rozprawy doktorskiej, ale też w siedmiu innych, oryginalnych pracach

badawczych (w dwu z nich mgr Janiszewska była pierwszym autorem). Artykuły te opublikowane zostały w czasopismach o bardzo wysokich wskaźnikach wpływu, jak np. Waer (IF 5.3), ACS Applied Materials & Interfaces (IF 7.2) czy European Polymer Journal (IF 5.8). Pomimo krótkiego czasu od publikacji, część z nich znalazła uznanie w środowisku naukowym i była już cytowana np. artykuł w ACS Applied Materials & Interfaces 15 razy. Autorka aktywnie uczestniczyła w konferencjach naukowych (5 krajowych, 3 międzynarodowych i jednej zagranicznej), prezentując tam wyniki swoich badań podczas wystąpień ustnych (5 wykładów) oraz sesji posterowych. Powyższa aktywność, w mojej ocenie, wypełnia zwyczajowe wymagania stawiane przed kandydatami na stopień doktora.

Rozprawę doktorską stanowi dobrze napisane opracowanie, zredagowane w języku polskim na 120 stronach, obejmujące: siedem rozdziałów poprzedzonych spisem treści, listą skrótów, wypunktowanym dorobkiem naukowym Autorki oraz (zgodnie z wymogami formalnymi) streszczeniem w języku polskim i angielskim. Pracę kończą: spisy rysunków i tabel oraz literatura (180 pozycji). Rozprawę rozpoczyna rozdział zatytułowany *Część teoretyczna*, który wprowadza czytelnika w tematykę badań nad polimerami i zawiera podstawowe informacje zarówno o polimerach i jak i białkach czyli głównych bohaterach tej pracy doktorskiej. Pierwsza część tego rozdziału to opis zawierający m.in. definicje takich pojęć jak architektura, izomeryczność czy taktyczność polimerów, rodzaje mieszanin polimerowych czy kopolimerów. W drugiej części tego rozdziału Autorka omawia struktury białkowe, w tym ich rzędowość, a także czynniki odpowiedzialne za wiązanie białek do innych struktur i powierzchni. Rozdział drugi jest zatytułowany *Część eksperymentalna* i zawiera spis i krótkie omówienie materiałów użytych w pracy (trzech polimerów i sześciu białek) oraz opisy teoretyczne stosowanych technik, zarówno tych związanych z przygotowaniem próbek jak i tych które służą Autorce do ich analizy doświadczalnej. Rozdział ten zapoznaje nas z podstawami tych technik, ale nie zawiera szczegółów technicznych czy też konkretnych parametrów przy jakich prowadzono preparatykę oraz eksperymenty (te szczegóły znajdują się w kolejnych rozdziałach opisujących wyniki czterech grup doświadczeń: odpowiednio 3.2, 4.2, 5.2 i 6.2). W tej części zabrakło mi szerszego przedstawienia celu pracy, który został jedynie ogólnie zarysowany we wstępie („Celem [...] jest pokazanie, że struktura łańcuchów polimerowych wpływa na właściwości cienkich warstw polimerowych a tym samym na oddziaływania z biomolekułami.”). Wprowadzenie w tematykę

badawczą i pokazanie aktualnego stanu wiedzy mogłoby znaleźć osobne miejsce (obecnie są to jedynie krótkie wprowadzenia do czterech rozdziałów z wynikami badań).

W tym miejscu nasuwa się pytanie czy mamy tu do czynienia z deklarowaną formą pełnej rozprawy doktorskiej czy *de facto*, ze spójnym tematycznie cyklem wieloautorskich prac oryginalnych. W moim odczuciu jest to raczej 'zszywka', w której mamy dwa rozdziały będące tłumaczeniami prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych (rozdziały trzeci i szósty) oraz dwa rozdziały (czwarty o orientacji białek, piąty o separacji fazowej) oparte o - będący w przygotowaniu - artykuł pt. „Orientacja białek i separacja fazowa mieszaniny polimerów wywołane taktycznością poli(metakrylanu metylu). W rozdziałach 3 i 6 są zamieszczone chyba wszystkie wyniki zawarte w artykułach, a w tekście rozprawy doktorskiej jest informacja o udziale tylko niektórych współautorów (np. hodowla bakteryjna i badania adhezji odbyła się we współpracy z prof. Moniką Brzychczy-Włoch oraz prof. Tomaszem Gosiewskim z Katedry Mikrobiologii UJ CM, czy kopolimery zostały zsyntetyzowane i scharakteryzowane przez dra Mariusza Gadzinowskiego i prof. Teresę Basińską a pomiary AFM wykonane przez prof. Tomasza Makowskiego z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN). Zapisy o udziale autorów zamieszczone w publikacji (*CRedit authorship contribution statement*) nie rozwiewają tych wątpliwości, a miejscami wręcz utrudniają rzetelną ocenę (np. w publikacji będącej źródłem dla rozdziału trzeciego Pani Janiszewska nie jest wymieniona jako współautorka manuskryptu (*Writing – original draft: Raczkowska, Gajos, Awskiuk*), którego tłumaczenie zamieszcza w ramach rozprawy doktorskiej). Zdecydowanie wnoszę o wyjaśnienie i uzupełnienie tych informacji podczas obrony.

Rozdział I i II zostały zredagowane, w mojej opinii, z dużą dbałością o precyzję sformułowań oraz szatę graficzną, a tekst uzupełniono o liczne grafiki i schematy (ponad 20 ilustracji), które są dobrze wybrane i znacząco pomagają czytelnikowi w zrozumieniu złożonych zagadnień.

Cztery kolejne rozdziały (III, IV, V i VI) to przede wszystkim prezentacja oryginalnych wyników badań. Rozdziały te mają bliźniaczą strukturę i każdy z nich jest złożony z czterech zasadniczych podrozdziałów: krótkiego Wprowadzenia, Wykorzystanych metod badawczych (tu znajdujemy właściwe szczegóły związane z przygotowaniem próbek, specyfikacją aparatury i parametrami pomiarów gdzie mgr Janiszewska zawarła zwięzły, ale dokładny opis

przeprowadzonych eksperymentów, pochodzenia i czystości związków chemicznych i białek; informacje te są wystarczające aby odtworzyć opisywane doświadczenia), Wyników badań i bardzo krótkiego Podsumowania. Podrozdział Wyniki badań, wbrew nazwie, nie zawiera jedynie rezultatów, ale znajdujemy tam również ich interpretacje i są one na bieżąco dyskutowane, Autorka przechodzi tu płynnie przez kolejne etapy analizy postawionego w danym rozdziale problemu badawczego.

Ostatni rozdział to *Podsumowanie*, gdzie Autorka syntetycznie przedstawia najważniejsze wyniki pracy i wskazuje możliwości ich zastosowań (np. tworzenie mikro macierzy białkowych w oparciu o eksperymenty z selektywną adsorpcją białek na dwuskładnikowych podłożach o zadanym wzorze graficznym). W zasadzie, można stwierdzić, że uważna lektura tego rozdziału pozwala wyodrębnić cele, które zostały zrealizowane w tej pracy doktorskiej.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji i istotnie przesuwają granice nauki, ale nasuwają jednocześnie pewne pytania czy komentarze:

1. Czy istotne znaczenie (jeśli tak to jakie) miał rozpuszczalnik (używano toluenu, chlorobenzenu i dimetyloformamidu) i stężenie polimeru (stosowano 10mg/mL, 15mg/mL, 20 mg/mL) podczas wylewania cienkich warstw?
2. W opisie teoretycznym metody pomiaru kąta zwilżania (rozdział 2.2.5) zwróciłbym większą uwagę na definicje wielkości fizycznych i rozróżnienie pomiędzy napięciem powierzchniowym a swobodną energią powierzchniową; uzupełniłbym ten rozdział o informację czy wielkości te zachowują się jak skalary czy jak wektory (patrz wzór 2.1 i rys. 2.17), a także komentarz dotyczący jednostek dla każdej z tych wielkości.
3. W pracy jest dużo obrazów pochodzących z pomiarów mikroskopii sił atomowych, a znalazło się tylko kilka obrazów ramanowskich czy fluorescencyjnych oraz równie mało odpowiednich widm. Jako recenzent-spektroskopista odczuwam niedosyt.
4. Czy wyniki zaprezentowanych w rozprawie badań można byłoby zastosować do tworzenia matryc dla układów mikro-przepływowych? Czy to w całości układu lub jako funkcjonalne bramki czy porty w systemach opartych o mikro-przepływy.
5. W oparciu o jakie kryteria dobierany był parametr odcięcia q , podczas analizy obrazów AFM, fluorescencyjnych i ramanowskich? Proszę o przykłady i omówienie tej procedury.
6. Szczegółowe opisy parametrów poszczególnych technik, które znajdują się w rozdziałach z wynikami badań z jednej strony powtarzają się (patrz np. Charakterystyka powierzchni w rozdziale 3, 4 i 6), a z drugiej strony mogłyby

zawierać informacje podane bezpośrednio. Np. określenie filtr U-MWIG2 jest precyzyjne, ale aby znaleźć informacje o tym jakie jest tam pasmo wzbudzenia, pasmo emisji, czy filtr dichroiczny należy znaleźć odpowiednią tabelę na stronie Olympusa. Moc lampy halogenowej (100W), czy moc lasera 532 nm (10mW) nie mówi nam nic o tym ile światła dochodzi do próbki podczas pomiaru. Dla samych polimerów nie jest to może aż tak istotne, ale dla bakterii czy białek już tak.

7. Brak definicji parametru RMS dla pomiarów AFM.
8. Jakie informacje dają nam obrazy fazowe w technice AFM? Na rysunku 6.2 zamieszczone są takie obrazy. Skalę w osi Z mają zupełnie inną niż odpowiadające im obrazy topograficzne. Proszę o szersze omówienie niż to zawarte w tekście.
9. W pracy pojawiają się rysunki i analizy oparte o czasy retencji. Nie opisano jednak co i z czego wpływa (jaka kolumna, jaka faza ruchoma, jakie parametry przepływu). Sprawy nie ułatwia odnośnik do literatury [151], gdyż brak tam danych bibliograficznych (są jedynie autorzy, tytuł i rok).
10. Co to za wielkość: 'parametr intensywności znormalizowanych sygnałów' (Tab. 4.3) i jak go wyliczono?
11. Co oznaczają przerywane linie na rys. 3.8?
12. Jaka wielkość fizyczna (i jakie jednostki) są na osi na rysunku 3.13?
13. W odniesieniach do literatury, stosunkowo często, pojawiają się pozycje przeglądowe. Można byłoby wskazywać czytelnikowi prace oryginalne. Np. na str. 21 jest fragment dotyczący badań i odkryć z lat 30. XIX w. a odnośnik [68] prowadzi do pracy o filamentach do druku 3D z 2022 r.
14. W opisie spektroskopii Ramana (rozdział 2.2.6, str. 39) Autorka używa słów umieszczonych w cudzysłowie ('kompleks', 'wirtualny stan cząsteczki'). Jeśli chcemy wytłumaczyć jakiegokolwiek zjawisko, nie możemy zakładać, że odbiorca zrozumie, co ten cudzysłów oznacza. W opisie rozpraszania Stokesa pojawia się określenie 'absorbacja energii', co w tym kontekście nie jest najwłaściwsze.
15. Autorka nie precyzuje jaki rodzaj niepewności pomiarowej jest podawany, np. w nawiasach w tabelach czy też na wykresach słupkowych i innych. Należy też podawać te niepewności z tą samą dokładnością (np. Tab. 3.3: wszystkie wielkości i niepewności powinny być podane z dwoma miejscami po przecinku).

Na podkreślenie zasługuje dobry poziom edytorski rozprawy. Praca jest estetyczna, z ładną szatą graficzną, czytanie ułatwia np. umieszczenie tytułu rozdziału w stopce. Chciałbym jednak zaproponować Autorce poniższe poprawki edytorskie:

1. Przeredagowałbym fragment na str. 38 „SFE opisuje stan równowagi [..], a tak naprawdę odzwierciedla stan nierównowagi [..]”.
2. Opisy do rysunków powinny wraz z rysunkiem tworzyć samodzielną całość. Zdarza się, że pod rysunkiem brak szczegółowego opisu, a znajduje się on jedynie w tekście, np. rys. 2.13 (brak opisu, co znaczą poszczególne kolory na tym rysunku), na rys. 2.15 nie wiemy czym jest element po prawej stronie schematu, czy na rys. 2.18 co oznacza różna grubość poszczególnych linii wśród poziomów oscylacyjnych.
3. Rozumiem, że w artykule oryginalnym w czasopiśmie naukowym, często możemy zamieścić jedynie ograniczoną liczbę rysunków i wtedy kompresujemy informacje, ale w pracy doktorskiej moglibyśmy sobie pozwolić na to, aby podzielić skomplikowane wykresy z korzyścią dla ich przejrzystości i czytelności (np. rys. 3.8).
4. Wiele opisów na rysunkach jest na granicy czytelności: np. skale na rysunkach AFM: rys. 3.1, 5.1, 5.2, 6.2; czy opisy osi na rys. 4.3, 5.3c.
5. Na rys. 3.4a (S4 w artykule oryginalnym) zostały zamienione nr serii pomiarowych 1-8 z 9-16. Dlaczego?
6. W części rysunków pozostały opisy w języku angielskim (np. 6.1).
7. Na rysunku 3.9a opis substancji dodawanych w kolejnych sekwencjach, ten na schemacie nie zgadza się z tym w podpisie. Również na tym rysunku kolory w części a) i b) oznaczają zupełnie co innego (raz rodzaj polimeru, raz rodzaj białka).
8. Co na rysunkach 3.11, 3.12 i 4.5 oznaczają ujemne czasy retencji? Na osi powinno znaleźć się oznaczenie Δt_R .
9. Na rys. 5.7 brak skali rozmiarowej. Również opis rysunków: topografia, kompozycja, adsorpcja białek nie jest jednoznaczny, właściwszy wydaje się opis odpowiednio obrazy: AFM, ramanowskie, fluorescencyjne.
10. Gdy staramy się wyjaśnić czytelnikowi, np. nową metodę mikroskopową to użycie słów obcych utrudnia zrozumienie np. na stronie 32 w jednym zdaniu pojawiają się: skaningowa, interakcja, niedestruktywna, topografia.
11. Użycie określeń żargonowych takich jak ‘sczytywanie’, ‘zmiany w sile’ (str. 33), czy ‘Scores na PC’ i ‘Loading na PC’ na wykresach analiz PCA (rys. 4.2, 4.4, 4.5, 6.3, 6.4), czy nie zdefiniowanych wcześniej ‘kłębek’ i ‘szczotka’ (rozdział 6, str. m.in. 87, 91), czy „zdjęcia kątów zwilżania” gdy na rysunku 6.5 widać krople może budzić konsternację u czytelnika mniej zapoznanego z tematyką.
12. Czasami Autorka używa sformułowania „ich cienkich warstw” odnosząc się do warstw utworzonych z polimerów (np. w *Streszczeniu*), właściwsze byłoby sformułowanie ‘tych’ lub ‘wytworzonych z tych polimerów’.

13. W liście skrótów znajdują się raz rozwinięcia polskie (PCA – analiza głównych składowych), w innych przypadkach angielskie (TCA – true component analysis). W większości przypadków można było zamieścić zarówno angielskie rozwinięcie, jak i polski odpowiednik.
14. Na str. 2 i 56 słowo „ilość” należy zamienić na „liczba” (dotyczy odpowiednio merów i arginin czy glutamin).
15. Bibliografia sformatowana jest niestarannie. W części pozycji brakuje danych bibliograficznych: 4 – brak wydawcy; 5 – nazwa czasopisma kapitalikami; 93 – nazwa czasopisma powinna być angielska: AHEM; brak nazwy czasopisma (141, 151); nazwy czasopism raz są pisane skrótami (104, 111), a czasem nazwami pełnymi (110, 105).
16. Drobne literówki (str. 1 dostępność → dostępności; str. 40 (podpis rys. 2.18) widami → widmami; str. 56 porówanku → porównaniu) czy ominięcia (str. 2, w pierwszym wierszu w 1.2.1 brak słowa ‘polimer’).

Powyższe uwagi natury edytorskiej absolutnie nie umniejszają jakości merytorycznej przedstawionej do recenzji rozprawy. Chcę raz jeszcze zaznaczyć, że rozprawę doktorską Pani mgr Janiszewskiej czyta się z przyjemnością i pewną lekkością, co zasługuje na pochwałę biorąc pod uwagę to, że zagadnienia, które są w niej omawiane są trudne i skomplikowane.

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, iż Pani mgr Natalia Janiszewska przedstawiła wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaplanowanych, tworzących logiczny ciąg i właściwie przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Badania te wymagały swobodnego poruszania się w ramach kilku podejść metodologicznych, znajomości wielu metod doświadczalnych, a także dobrej organizacji i sporej pracowitości. **W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Niniejszym składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Natalii Janiszewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne, w tym do publicznej obrony.**

Gratuluje Doktorantce oraz Panu Promotorowi cennych rezultatów badań.

Wojciech Guzowski