



Prof. dr hab. Janina Gabrielska

Wrocław 09.03.2020 r.

***Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Zawilskiej pt. „Ocena właściwości fizyko-chemicznych modelowych błon biologicznych modyfikowanych przez 5-n-alkilorezorcynole”***

Promotor pracy: dr hab. Jerzy Gubernator

Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Cieślik- Boczula

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Patrycja Zawilska zajęła się zbadaniem oddziaływań pomiędzy wybranymi, nasyconymi homologami alkilorezorcynoli (5n-AR) a dwuwarstwą lipidową formowaną z syntetycznej dipalmitoilfosfatydylocholi (DPPC). Jako główny cel postawiła sobie określenie właściwości fizyko-chemicznych tej dwuwarstwy, jej organizacji molekularnej po modyfikacji 5n-AR. W szczególności skoncentrowała się nad otrzymaniem odpowiedzi związanej z oceną zakresu wpływu 5n-AR na termotropowe przejścia fazowe dwuwarstwy DPPC, zmianami w występowaniu wiązań wodorowych pomiędzy molekułami 5n-AR i fosfolipidów, jej stopieniem uwodnienia oraz możliwością indukowania separacji faz. Oceniała także rozmiary formowanych liposomów DPPC w obecności 5n-AR w funkcji temperatury. Doktorantka zajęła się zbadaniem wpływu homologów AR na błony lipidowe z powodu niewystarczających danych w literaturze światowej dotyczących oddziaływań w tych układach. Ponadto zagadnienia związane z AR są kontynuacją podjętych już od wielu lat badań w Zakładzie Lipidów i Liposomów na Wydziale Biotechnologii UW. Do swojej pracy wybrała 6 homologów 5n-alkilorezorcynoli, wyekstrahowanych z otręb żytnich, o wzrastającej długości łańcucha alkilowego (zawierających C15, C17, C19, C21, C23 i C25) w oddziaływaniu z błonami modelowymi w wymienionych już aspektach. Są one interesującym obiektem badań ze względu na dobroczynny wpływ na organizm tych substancji spożywanych w diecie pełnoziarnistej człowieka np. w przypadku chorób nowotworowych przewodu pokarmowego. Pozytywny ich wpływ wiąże się m.in. z zagadnieniem obniżania poziomu trójglicerydów we krwi, inhibicją lipooksygenaz oraz wpływem na prawidłowość procesów przemian kwasów tłuszczowych i fosfolipidów.

We Wstępie pracy będącym Częścią teoretyczną/literaturową Doktorantka omawia zagadnienia związane z modelem błony komórkowej zwierzęcej oraz modelami błon lipidowych w tym m. in. szerzej opisuje przejścia fazowe w dwuwarstwie lipidowej. Uzasadnia na podstawie danych literaturowych zebranych w Tabeli 2, wykazujących wysoką zawartość reszt kwasów tłuszczowych zawierających 16 atomów węgla w PC, zastosowanie syntetycznej dipalmitoilfosfatydylocholi (DPPC) o tej właśnie



długości łańcucha w swoich badaniach. W dalszej części zawarła informacje związane z lipidami fenolowymi w tym alkilorezorcynolami - ich występowaniem, właściwościami i aktywnością biologiczną. Na podstawie chociażby liczby cytowań znajdujących się w opisie podrozdziału „Aktywność biologiczna lipidów fenolowych” (str. 40-45) można się zorientować, że to zagadnienie związane jest w dużej części opisu z osiągnięciami naukowymi pracowników i współpracowników z Zakładu Lipidów i Liposomów Wydziału Biotechnologii w tym Doktorantki. Na 42 cytowania aż 52% publikacji jest z Ich współautorstwem.

Wszystkie badania podjęte w rozprawie przez Panią mgr Patrycję Zawilską były zrealizowane w zasadzie na jednorodnych obiektach badawczych, modelowych błonach formowanych z DPPC, które w zależności od zastosowanych metod były liposomami jedno- lub wielowarstwowymi oraz płaskimi warstwami wzbogacanymi w cholesterol lub bez niego oraz w obecności alkilorezorcynoli. Prowadziła je przy zastosowaniu nowoczesnych metod eksperymentalnych, w których wykorzystwała spektroskopię absorpcyjną, fluorymetrię, mikrokalorymetrię różnicową, spektroskopię IR z transformacją furiera (FTIR-ATR) oraz dynamicznego rozproszenia światła (DLS). W przypadku techniki IR uzyskane wyniki analizowała metodą PCK – głównych składowych widm.

Jestem pełna podziwu dla umiejętności eksperymentalnych Doktorantki i podjęcia się tak dużego zakresu różnych, trafnie wybranych metod/technik badań w odniesieniu do jednego z podstawowych elementów błon biologicznych, jakim jest dwuwarstwa lipidowa.

Praca ma układ klasyczny, liczy 198 stron (4 strony: 8, 46, 50 i 162 to puste kartki). Syntetycznie jest opisana Część teoretyczna, która liczy 31 stron nazwana Wprowadzeniem, poprzedza ją Streszczenie rozprawy, także w wersji angielskiej. Ten wartościowy opis teoretyczny dobrze wprowadza w obszar zagadnień łączących się z zaplanowanymi badaniami, opisany na 100 stronach rozprawy, kolejno rozdziałów Część eksperymentalna (13 str.) oraz Wyniki i Dyskusja (85 stron). Rozprawa zawiera także Podsumowanie i Wnioski oraz 206 pozycji bibliograficznych, z czego ok. 42% pochodzi z ostatnich 19-stu lat (od 2000 roku) w tym ok. 19% i 9% jest odpowiednio z ostatnich 10 i 5 lat. Warto pozytywnie ocenić element końcowy rozprawy tzw. Suplement, w którym znalazły się: wykresy od 65-77 (tj. opracowane dla wyników wartości GP Laurdanu w liposomach w funkcji długości fali wzbudzenia), zestawienie dorobku publikacyjnego Doktorantki (w tym doniesień konferencyjnych), spis rysunków, tabel i wykresów zamieszczonych w dysertacji.



W „Części eksperymentalnej”, poprzedza ją rozdział „Założenia i cel pracy”, Doktorantka opisała procedury użyte m. in. do izolacji ekstraktów rezorcynolowych, uwodornienia, ich separacji na poszczególne homologi, identyfikacji oraz określenia temperatury topnienia i współczynnika podziału w układzie oktanol:woda dla trzech długołańcuchowych związków. Wyznaczenie współczynnika podziału budzi pewne wątpliwości czytającego chociażby ze względu na błędne wartości  $\log k_w$ , (współczynnika referencji) dla standardów naniesione na wykresie 3. Stąd moje pytanie czy nie wymagają weryfikacji wartości współczynników podziału? W tabeli 13 zawarte są przedziały ich wartości, zamiast wielkości średnich z niepewnością pomiaru np. odchyleniem standardowym średniej, skąd one wynikają? Również sposób przygotowywania próbek do pomiarów DSC jest mało precyzyjny, nasuwają się pytania proceduralne np. o czas homogenizacji, czas i prędkość wirowania, masę próbek – wymaga to uzupełnienia.

Doktorantka na podstawie analizy temperaturowych zmian parametru polaryzacji uogólnionej (GP) oraz anizotropii fluorescencji sondy Laurdan wbudowanej do błony liposomów wyznaczyła wartości temperatury głównego przejścia fazowego (pomiędzy fazą  $P_{\beta}$  tzw. pofałdowaną  $\rightarrow$  a fazą  $L_{\alpha}$  ciekłokrystaliczną) oraz stężeniowo-zależne przesunięcie w kierunku wyższych wartości  $T_m$  dla błon domieszkowanych homologami AR. Wzrost ilości AR w dwuwarstwie wiązał się/powodował odmienne efekty, gdy przyjrzeć się zmianom anizotropii Laurdanu w zakresach niskotemperaturowych i tych powyżej  $T_m$ . A mianowicie w fazie niskotemperaturowej względna anizotropia sondy w obecności wzrastającego stężenia AR nieznacznie spadała (o 0,02) oznaczając niewielki wzrost rotacji sondy Laurdan natomiast w fazie ciekłokrystalicznej błony lipidowej wartość anizotropii rosta o ok. 0,04 w tym samym zakresie zmian stężenia AR, co świadczyło o ograniczaniu jej dyfuzji rotacyjnej. Ponadto na podstawie dużych wzrostów parametru GP indukowanego AR w temperaturach powyżej  $T_m$  wskazała na prawdopodobny efekt dehydratacji błony i/lub jej usztywnienie. Zmniejszoną hydratację błony domieszkowanej w tych wysoko temperaturowych zakresach zaobserwowała również w późniejszych, kolejnych eksperymentach przy użyciu techniki ATR-IR. Podsumowując te rezultaty badań Doktorantka zasugerowała cholesterolowo-podobny charakter oddziaływania molekuł homologów AR z dwuwarstwą DPPC. Ponadto po wykonaniu szeregu doświadczeń dotyczących zależności intensywności fluorescencji zarówno w funkcji temperatury (w zakresie od ok. 11 C do 62,8C) jak i długości fali wzbudzenia sondy, wykluczyła w zakresie domieszkowania AR do 50 mol% - błony DPPC:AR; do 40 mol% błon DPPC:Chol oraz do 30 mol% błon DPPC:Chol:AR możliwość tworzenia separacji faz.



Kolejnym etapem zrealizowanych badań, była szeroko zakrojona analiza widm w podczerwieni uwodnionych błon nie- i domieszkowanych AR oraz suchych układów. Obejmowała ona różne obszary spektralne widm ATR-IR, obrazujące wpływ domieszek na płynność dwuwarstwy. W jej wyniku wykazała między innymi, w błonie lipidowej duży raptowny wzrost konformacyjnego upakowania lipidów w temperaturze  $T_m$  (głównego przejścia fazowego) i wzrosty o takim samym charakterze zaburzenia heksagonalnego bocznego upakowania łańcuchów węglowodorowych oraz znaczący wzrost hydratacji molekuł lipidowych w ich obszarze ugrupowań estrowych. W błonach domieszkowanych 5-AR w ilości 15 mol% te duże zmiany w powyższych procesach miały również miejsce, natomiast temperatura  $T_m$  w obecności wszystkich lipidów fenolowych była wyższa w porównaniu z  $T_m$  dla niedomieszkowanych błon. Dodatkowo zmiany w zakresie pasma ugrupowania estrowego lipidów (C=O) wskazały na dehydratację, najprawdopodobniej w procesie konkurencji pierścienia fenolowego w cząsteczkach AR o miejsca wiążące, który lokuje się w tym obszarze polarnego rejonu dwuwarstwy. Takie zlokalizowanie zostało następnie potwierdzone przez Doktorantkę na podstawie analiz spektralnych polarnego obszaru błony, przeprowadzone na suchych filmach DPPC w obecności AR. W przypadku odwodnionych filmów domieszkowanych dodatkowo zaobserwowała tworzenie intermolekularnych wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniami hydroksylowymi przy pierścieniu aromatycznym a fosforowymi  $PO_2^-$  fosfolipidów.

W końcowym etapie realizacji zaplanowanych badań Doktorantka, na podstawie analizy rozkładu wielkości agregatów liposomowych także z zawartością AR, którą przeprowadziła metodą DLS oraz danych literaturowych, wskazała na interesujące cechy tych niejednorodnych pod względem składu agregatów. Mianowicie, ze względu na ich dużą objętość zamkniętą oraz polepszoną stabilność długookresową, zapostulowała uszczelniającą funkcję przebadanych alkilorezorcynoli, naśladujących pod tym względem cholesterol w błonie. Stąd potencjalnie aplikacyjny aspekt tych badań wiąże z ich wykorzystaniem przy projektowaniu liposomowych nośników leków.

Co do najważniejszych wniosków zamieszczonych w doktoracie, to uważam, że w przypadku tych sformułowanych w punktach a-d są one podsumowaniem uzyskanych wyników, natomiast dwa ostatnie są wnioskami z badań.

Jeszcze kilka zastrzeżeń/uwag, co do edycji pracy oraz wymienię nieliczne nieścisłości, które zauważyłam podczas czytania rozprawy a które mogą być pomocne w kolejnym przygotowaniu wyników



do opublikowania: **1)** Wykresy 27 i 28 można by przedstawić rozciągając skalę rzędnych i przyjęc większą wartość jednostki, co poprawiłoby możliwość oceny przez czytającego dyskutowanych wyników. Także wielkość symboli poszczególnych punktów powinna być ujednolicona raczej do rozmiarów bardziej czytelnych – np. jak na wykresie 18; **2)** Wykres 17 – jest mało czytelny (zbyt dużo przebiegów), a można by go przedstawić np. w postaci 3 paneli (wyodrębniając przebiegi dla wszystkich homologów w ustalonej temperaturze ( $T_{max}$ ,  $T_m$  i  $T_{min}$ )); **3)** Wykres 18, sprawna ocena wymaga przedstawiania wszystkich jego 6-ciu elementów w jednakowym zakresie zmian wartości na osi rzędnej; **4)** Podpis pod wykresem 16 jest pomyłkowy; **5)** należałoby ujednolicić wartości domieszkowania AR w błonach liposomów, pisane są bowiem w różnej konwencji: np. 9,5:0,5 (Tab. 15 i 16, wykresy 15 i 16) lub 95:5 (Tab. 18), co; **6)** str. 146 – Zdanie „W badanych układach DPPC przesunięcie maksimum pasma  $\nu_{as}N(CH_3)_3$  jest w kierunku wyższych częstości,„ zamiast „...w kierunku wyższych liczb falowych; **7)** W Spisie literatury zauważyłam powtórzenia cytowań np. poz. 91 i 93 oraz poz. 92 i 100. Tak jak już wspomniałam, że to są mało ważne uwagi, być może pomocne w dalszej działalności naukowej Doktorantki.

Mam także następujące pytania do Doktorantki:

1. Jak mogłaby wyjaśnić/ocenić różnice uzyskane trzema technikami pomiarowymi gdy chodzi o wartości temperatury głównego przejścia fazowego  $T_m$  dla DPPC w obecności wszystkich badanych AR np. w przypadku domieszki 85:10, które w stosunku do kontroli wynoszą:  $\Delta T = 1,3$  K – dla anizotropii Laurdanu;  $\Delta T = 3,2$  K – w metodzie IR oraz  $\Delta T = 0,8$  K – dla GP Laurdanu?
2. Czy może skomentować wyniki uzyskane metodą DSC dla całej serii 6 homologów na podstawie także danych literaturowych, wykres 4 jest sporządzony tylko dla danych literaturowych, także w kontekście pytania 1?
3. Nie ma danych na temat liczby niezależnych powtórzeń poszczególnych eksperymentów oraz nie ma takiej informacji np. pod wykresami o sposobie wyznaczania niepewności pomiarów – proszę o uzupełnienie tych informacji. Jest szereg wykresów bez naniesionych niepewności pomiarów np. 57, 53, 51, 50, 48, 47, 44, 41 itd. Wartości  $T_m$  wyznaczone różnymi metodami nie posiadają niepewności pomiarów (Tab. 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14). Jedynie w Tab. 12 podane są niepewności pomiaru z dokładnością do  $0,1^\circ C$ , natomiast same wartości  $T_{top}$  homologów AR nie posiadają takiej dokładności?



4. Jak mogą nawiązać/dopomagać wyjaśniać na przykładzie, uzyskane rezultaty badań aktywność biologiczną homologów AR? To nawiązanie do zamieszczonego stwierdzenia zarówno w Streszczeniu jak również w Podsumowaniu i Wnioskach pracy (str. 11 oraz str. 151).

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo pozytywnie/bardzo dobrze. Jest napisana poprawnym językiem i zawiera bardzo nieliczne uchybienia tak zwane literówki (np. str. 171, 148, 126, 122). Moim zdaniem wykonane badania tj. pomiary oraz uzyskane wyniki i ich interpretacja spełniają postawione cele naukowe. Osiągnięcia pracy są wartościowe nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale również z potencjalnie aplikacyjnego. Doktorantka zastosowała szereg metod, którymi biegle się posługiwała. Wspomnę, że przedstawione w rozprawie rezultaty zostały już w części opracowane w formie oryginalnego artykułu w Biophysical Chemistry z listy A czasopism MNiSZW (IF=1,745; 70 pkt.) a inna ich część wysłana do opublikowania w Eur. J. Pharmaceut. Sciences, 100 pkt; jest w recenzji. Jest również współautorką innej publikacji oraz 1 publikacji w przygotowaniu. Łączna liczba punktów MNiSZW za opublikowane prace wynosi 210 a współczynnik oddziaływania IF = 4,668 (liczba współautorów – 7). Ponadto jest współautorką 5 doniesień pokonferencyjnych opublikowanych w zagranicznych czasopismach znajdujących się w bazie Web of Science (40 pkt, IF=11,3) oraz 8 innych doniesień konferencyjnych, zarówno krajowych jak i zagranicznych, w tym wystąpienia ustnego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie wymogi ustawowe określone w Rozporządzeniu MNiSZW z dnia 30 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r, poz. 261) oraz w świetle przepisów wprowadzających ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669), dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Zawilskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

9 03. 2020r.

Jawna Gabnelka