



**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

prof. dr hab. Maria Bryszewska  
Kierownik Katedry Biofizyki Ogólnej

Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Zawilskiej

**„Ocena właściwości fizyko-chemicznych modelowych błon biologicznych modyfikowanych przez 5-*n*-alkilorezorcynole”**

Promotor pracy: dr hab. Jerzy Gubernator

Promotor pomocniczy pracy: dr hab. Katarzyna Cieślik-Boczula

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Patrycja Zawilska zajęła się badaniem oddziaływań długołańcuchowych homologów alkilorezorcynoli (AR) pozyskiwanych z otrąb żytnich z modelowymi błonami lipidowymi jedno-(DPPC) bądź dwuskładnikowymi (DPPC/Chol). Do podjęcia tego tematu skłoniła ją powszechność występowania tych związków w świecie roślinnym i doniesienia o ich właściwościach antybakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych, co powoduje rosnące zainteresowanie możliwością zastosowania ich w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Praca doktorska mgr Patrycji Zawilskiej jest jednocześnie kontynuacją badań prowadzonych od wielu lat przez zespół A. Kozubka i Jego współpracowników, autorów kilkadziesiąt publikacji z zakresu modyfikacji właściwości lipidowych błon modelowych przez alkilorezorcynole. Głównym celem postawionym sobie przez Doktorantkę było zbadanie wpływu długołańcuchowych AR na wybrane właściwości biofizyczne błon modelowych jedno- bądź dwuskładnikowych, m.in. takie jak termotropowe przejścia fazowe, stopień uwodnienia, tworzenie domen błonowych w obrębie dwuwarstwy. Materiałem badawczym były dwuwarstwowe błony lipidowe (liposomy) zbudowane z dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) lub mieszaniny DPPC z

cholesterolem, które poddawane były działaniu długołańcuchowych nasyconych alkilorezorcynoli o liczbie atomów węgla od 15 do 25.

Doktorantka zrealizowała swoje zamierzenia badawcze stosując różnorakie nowoczesne techniki badawcze, w tym technikę spektroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem znacznika Laurdan, dynamicznego rozproszenia światła (DLS), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-IR) wspartą analizą czynników głównych PCA.

Praca ma układ klasyczny. Rozpoczyna ją *Wykaz skrótów i symboli* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. *Część teoretyczna* rozprawy to ponad 30 stron tekstu składającego się w zasadzie z dwóch części. W pierwszej Doktorantka opisuje strukturę i skład błon biologicznych, szczególną uwagę poświęcając lipidom błonowym i wyjaśniając, dlaczego do swoich badań na błonach modelowych wybrała dipalmitoilofosfatydylocholinę (DPPC). Nie do końca się zgadzam ze stwierdzeniem, że to „...wysoka zawartość DPPC w błonach biologicznych tłumaczy jej użycie w badaniach modelowych dwuwarstw lipidowych...”. Myślę, że nie jest to jedyny powód tak szerokiego stosowania tego lipidu w badaniach membranologicznych. Dopiero w późniejszej części opisu pojawia się bardziej szczegółowe uzasadnienie tego wyboru. Ta część pracy zawiera opis tzw. koncepcji kształtu i przejść fazowych fosfolipidów wchodzących w skład błon biologicznych i warunków, w jakich tworzą się tzw. tratwy lipidowe. Kontynuując część teoretyczną Doktorantka przechodzi do opisu błon modelowych, ich właściwości fizyko-chemicznych, termotropowych przejść fazowych, szczególną uwagę poświęcając termotropowym przejściom fazowym w fosfatydylocholinach. Omawia oddziaływania między lipidami prowadzące do powstawania określonych struktur przestrzennych, w tym dwuwarstw w postaci liposomów, będących bodaj najpopularniejszą badaną strukturą. Następnym podrozdziałem pracy jest szczegółowa klasyfikacja i opis lipidów fenolowych, ich występowania w materiale biologicznym, nie tylko roślinnym, oraz charakterystyka ich aktywności biologicznej i właściwości fizyko-chemicznych.

Kolejny rozdział to *Założenia i Cele pracy*, w którym Doktorantka prawidłowo formułuje cel ogólny i cele szczegółowe podjętych badań, po którym następuje obszerna (ok. 100 stron + ponad 20 stron suplementu) *Część Eksperymentalna* dzieląca się na *Materiały i Metody* oraz *Wyniki i Dyskusję*.

Pierwszym etapem badań było wyizolowanie z otrąb żytnich mieszaniny homologów AR, następnie ich oczyszczenie metodami chromatograficznymi, uwodornienie w celu redukcji wiązań nienasyconych i rozdział na odpowiednie frakcje z zastosowaniem HPLC. Do badań wzięto 6 frakcji: AR(15:0), AR(17:0), AR(19:0), AR(21:0), AR(23:0) i AR(25:0), które poddano szczegółowej analizie fizyko-chemicznej. Taki wybór związków pozwolił na zbadanie wpływu długości łańcucha AR na sposób oddziaływania tych związków z błoną.

Do badań wpływu powyższych AR na błony modelowe przygotowano wielowarstwowe i jednowarstwowe liposomy DPPC, DPPC:Chol, DPPC:AR i DPPC:AR:Chol używając ich odpowiednio do stosowanej techniki badawczej.

Jak już wspomniałam wyżej, mgr Patrycja Zawilska do realizacji swoich zamierzeń badawczych zastosowała kilka nowoczesnych technik badawczych i choć, jak sama pisze, za najważniejszą uważa metodę wykorzystującą fluorescencję, to mnie najbardziej podobał się opis i interpretacja wyników pozyskanych metodą ATR-IR.

Do *Części Eksperymentalnej* mam następującą uwagę – sędzę, że bardziej prawidłowe byłoby opisanie stosowanych w pracy metod w części *Materiały i Metody*, a nie *Wyniki i Dyskusja*, co nawet sugerują tytuły tych podrozdziałów.

Nie jest rolą recenzenta szczegółowe omawianie uzyskanych przez Doktorantkę wyników, lecz ich ocena. W mojej opinii uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie istniejącej literatury przedmiotu, poszerzają naszą wiedzę o oddziaływaniach lipid-lipid na poziomie molekularnym i na temat modyfikacji modelowych błon lipidowych będących wynikiem tych oddziaływań. Budzą zaufanie, bo zostały uzyskane komplementarnymi technikami badawczymi, które dodatkowo pozwoliły na monitorowanie zmian struktury w różnych regionach dwuwarstwowej lipidowej zachodzących pod wpływem alkilorezorcynoli.

Po rozdziale *Wyniki i Dyskusja* zamieszczona została bibliografia, na którą złożyło się 208 pozycji literaturowych i wspomniany już wyżej *Suplement*. Ogółem rozprawa liczy 207 stron, stanowiąc bardzo obszerne opracowanie tematu. Można było je nieco skrócić, gdyby nie niepotrzebne wg recenzenta, dublowanie w wielu przypadkach prezentacji wyników zarówno w postaci wykresu, jak i tabeli. W wykazie literatury można dostrzec wiele pozycji autorstwa Doktorantki, co pozwala uzasadnić wystarczający do nadania stopnia doktora dorobek Kandydatki.

Praca jest dosyć starannie opracowana pod względem edytorskim, jednakże Doktorantka nie ustrzegła się licznych drobnych błędów, tzw. literówek, kilku mniej drobnych błędów jak „homologii” zamiast „homologi” oraz niezbyt poprawnych stylistycznie sformułowań. Nie sądzę, aby było wskazane wymienianie ich w tym miejscu, ponieważ nie mają wpływu na moją wysoką ocenę rozprawy. Chcę tylko zwrócić uwagę, że nie można mówić o anizotropii Laurdanu, tylko anizotropii fluorescencji (emisji) Laurdanu.

Podsumowując uważam, że praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom naukowym na stopień naukowy doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych, zwracam się więc do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego z prośbą o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Patrycji Zawilskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
KATEDRY BIOFIZYKI OGÓLNEJ UE  
  
prof. zw. dr hab. Maria Bryszewska