



UNIWERSYTET
O P O L S K I

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole
tel. 077 452 71 00
fax 077 452 71 01
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. dr hab. Małgorzata Broda,
Wydział Chemii
Uniwersytet Opolski
Ul. Oleska 48
45-052 Opole
Tel.: 77 542 7132

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Kuć

pt. „Wpływ wybranych cząsteczek o właściwościach anestetycznych na struktury modelowych błon lipidowych”

Promotor pracy: prof. dr hab. Maria Rospenk

Promotor pomocniczy: dr hab. Katarzyna Cieřlik-Boczula

W swojej rozprawie doktorskiej Pani Marta Kuć zajęła się zbadaniem oddziaływania wybranych anestetyków z modelowymi błonami lipidowymi. Głównym celem podjętych badań było określenie w jakim stopniu domieszkowane substancje modyfikują strukturę dwuwarstwy lipidowej i zmieniają temperaturę przejścia fazowego oraz w jakich obszarach błony lokują się najsilniej. Jako podstawową metodę badawczą wybrano spektroskopię w bliskiej podczerwieni (NIR) w zakresie pierwszych nadtonów drgań rozciągających grup CH₂ a informacje o modyfikacjach dynamiki i stopnia uporządkowania różnych rejonów modelowych błon DPPC uzyskano dzięki zastosowaniu spektroskopii EPR..

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Marty Kuć jest kontynuacją badań prowadzonych od kilku lat przez Promotora rozprawy głównie metodami spektroskopii molekularnej.

Badanie na poziomie molekularnym modyfikacji struktury warstw lipidowych przez substancje o określonej aktywności biologicznej jest ciągle aktualnym zagadnieniem naukowym leżącym na pograniczu chemii, biologii i medycyny. Ze względu na złożony skład naturalnych błon komórkowych bezpośrednia analiza takich układów jest bardzo trudna. Z tego powodu tworzy się uproszczone modele błon biologicznych, aby za pomocą takich biomimetycznych układów badać na przykład oddziaływanie wybranych środków leczniczych na strukturę, dynamikę i inne parametry błony.

Pomimo, że anestetyki to strukturalnie zróżnicowana grupa leków, wywołują one ten sam efekt kliniczny – znieczulenie. Wiadomo, że aktywność biologiczna wżewnych środków znieczulających modyfikuje działanie kanałów jonowych w błonie komórkowej, jednak mimo ciągle prowadzonych, intensywnych badań w tym zakresie, molekularny mechanizm tej aktywności nie jest w pełni poznany. Jednym z możliwych sposobów wywoływania tego efektu biologicznego jest modyfikacja struktury błony lipidowej otaczającej białko w wyniku specyficznego oddziaływania z anestetykami. Podjęty przez Doktorantkę temat sytuuje się w najnowszych nurtach badawczych i ma ogromne znaczenie poznawcze oraz aplikacyjne.

Doktorantka zaplanowała, przeprowadziła i szczegółowo opisała rezultaty wielu eksperymentów spektroskopowych z wykorzystaniem:

- spektroskopii oscylacyjnej w zakresie średniej podczerwieni (MIR) do obserwacji zmian konformacyjnych modelowych błon lipidowych. Zastosowano technikę ATR do zarejestrowania widm IR w zakresie $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ w funkcji wzrastającej temperatury

- techniki spektroskopii oscylacyjnej w zakresie bliskiej w podczerwieni (NIR) – co jest nowym, nieopisanym dotąd w literaturze przedmiotu, sposobem badania właściwości strukturalnych tego typu układów.

- spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), która pozwoliła na śledzenie zmian dynamiki liposomów w różnych obszarach dwuwarstwy pod wpływem użytych anestetyków.

Praca jest dość obszerna. Liczy 228 stron, zawiera 9 tabel, 98 rysunków i 295 pozycji literaturowych. Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Kuć została napisana według układu klasycznego. Dzieli się na przegląd literatury przedmiotu, jasno sformułowany cel pracy, po

którym następuje opis stosowanych metod spektroskopowych i metod chemometrycznych stosowanych do analizy uzyskanych wyników. Najbardziej obszerny (liczący 95 stron) jest rozdział zatytułowany „*Wyniki i dyskusja*”. Pracę kończy „*Podsumowanie i wnioski*”, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz zestawienie cytowanej literatury.

W rozdziale zatytułowanym „*Blony biologiczne*” Autorka przedstawiła tytułowe zagadnienie zdecydowanie z punktu widzenia chemika. Z całej różnorodności strukturalnej naturalnych membran ograniczyła się do omówienia budowy chemicznej lipidów błonowych. Następny fragment tego rozdziału dotyczył dynamiki błon biologicznych i płynności dwuwarstwy lipidowej, chociaż zagadnienie różnych form agregacji cząsteczek lipidów, w tym tworzenie dwuwarstwy, zostało przedstawione dopiero w kolejnym rozdziale.

Następne trzy rozdziały części literaturowej poświęcone zostały dość szczegółowemu przedstawieniu temperaturowo-zależnych przemian fazowych błon biologicznych oraz budowy liposomów a następnie opisane zostały właściwości anestetyków wziewnych badanych w ramach recenzowanej pracy: halotanu, enfluranu, izofluranu i sewofluranu.

Kolejny, bardzo skrótowo napisany, rozdział „*Metody badawcze układów błonowych*” poświęcony został przedstawieniu tych metod spektroskopowych, które zostały wykorzystane w pracy do pozyskania informacji o zmianach strukturalnych zachodzących w liposomach pod wpływem środków znieczulających. Moim zdaniem za dużo w tym fragmencie pracy jest bardzo podstawowych informacji (np. definicja nadtonu i pasm kombinacyjnych) a za mało bardziej specjalistycznych danych (np. jak zmiana konformacji dwuwarstwy lipidowej przejawia się w widmie IR) To byłoby lepszym wprowadzeniem w tematykę pracy i dałoby podstawę do dalszego omówienia i interpretacji wyników przeprowadzonych eksperymentów.

W rozdziale zatytułowanym „*Wyniki i dyskusja*” Pani mgr. Marta Kuć przedstawiła systematycznie wyniki swoich eksperymentów spektroskopowych zaplanowanych tak, aby doprowadzić do odpowiedzi na pytanie o skutki działania wybranych anestetyków wziewnych na proces przejścia fazowego błon DPPC i DPPG czystych oraz domieszkowanych cholesterolem. Ponadto zastosowanie techniki EPR z trzema różnymi sondami spinowymi miało na celu stwierdzenie jaki jest wpływ badanych anestetyków na dynamikę modelowej błony w różnych jej obszarach – hydrofilowym, hydrofobowym lub w rejonie interfazy dwuwarstwy lipidowej.

Autorka zrealizowała zaplanowane cele badawcze, wykazała się pracowitością i starannością. Do najważniejszych osiągnięć recenzowanej pracy zaliczam:

- ✓ Wykazanie, że spektroskopia w bliskiej podczerwieni może być alternatywą, do spektroskopii w średniej podczerwieni, metodą badania przejść fazowych błon lipidowych i daje analogiczne wyniki dotyczące wpływu domieszek na strukturę błon i temperaturę ich głównego przejścia fazowego
- ✓ Ustalenie, na podstawie temperaturowo-zależnych widm w bliskiej podczerwieni w obszarze pierwszych nadtonów drgań rozciągających symetrycznych i asymetrycznych grup CH₂, że pod wpływem anestetyków obniża się temperatura przejścia fazowego T_m, i efekt ten jest największy dla halotanu a najmniejszy dla sewofluranu.
- ✓ Pokazanie, dzięki zastosowaniu spektroskopii EPR, że badane środki znieczulające najsilniej modyfikują strukturalnie hydrofilowy obszar błony a najsłabiej – hydrofobowy. Modyfikacja polega na usztywnieniu dwuwarstwy lipidowej i jej wielkość zależy od rodzaju anestetyku.

Wymienione osiągnięcia naukowe spełniają w pełni zwyczajowe i formalne wymagania stawiane pracom doktorskim. Ich uzyskanie wymagało od Doktorantki nie tylko bardzo dużego nakładu pracy, ale przede wszystkim sporej wiedzy, staranności w przeprowadzeniu eksperymentów spektroskopowych w celu uzyskania wyników analitycznych o wysokiej jakości. Osiągnięte przez Doktorantkę rezultaty najlepiej świadczą o tym, że taką wiedzą i umiejętnościami w pełni dysponowała.

Wywiązując się z obowiązków recenzenta chciałabym również zwrócić uwagę na pewne uchybienia i niejasności.

- strona 17, linia 4 od góry: zapewne przez pomyłkę, metanol został wymieniony jako jeden z rozpuszczalników niepolarnych

- strona 63, linia 6 od góry: woda to nie jest „ditlenek wodoru”, powinno być: tlenek wodoru, ew. zgodnie z nomenklaturą IUPAC: oksydan

- strona 50, linia 5 od góry: powinno być „absorpcja” – czyli proces pochłaniania energii fali elektromagnetycznej, a jest „absorbancja” – czyli miara ilości światła zaabsorbowanego.

- Schematy 3.1 i 3.2 są zupełnie zbędne. Informację w nich zawartą można przedstawić jednym dość krótkim zdaniem, i nie ma powodu poświęcać na nie dwóch stron pracy.

- strona 90, pierwsza linia od góry: brakuje słowa „procesu”

- strona 92, linia 4 od dołu: Autorka stwierdza, że zmiana temperatury przejścia fazowego pod wpływem dodanego do liposomu anestetyku sugeruje „zachodzenie interakcji”, nie podaje jednak co z czym oddziałuje. Podobnie na stronie 95, linia 2 od dołu: Uwaga, że obserwowane zmniejszenie temperatury przejść fazowych jest wynikiem „mających miejsce w badanych systemach oddziaływań” bez podania między jakimi cząsteczkami, lub ich fragmentami to oddziaływanie zachodzi, nie daje żadnej nowej informacji.

- Na ogół Autorka stosuje przecinek do oddzielenia części całkowitej i dziesiętnej liczby, jednak w kilku miejscach jest kropka (np. strona 67, linia 4 od góry; rysunek 4.3; rysunek 4.5; rysunek 4.8)

- strona 175, linia 8 od góry: Autorka stwierdziła, że halotan powoduje największą modyfikację właściwości błon bo jest najmniejszy. Może to i być prawdą, ale nie zostało poparte żadnymi argumentami ani danymi literaturowymi.

Wymienione powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają mojej wysokiej oceny merytorycznej strony pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Marty Kuć jest dowodem szerokiej wiedzy Autorki i umiejętności samodzielnego prowadzenia badań z obrębie tematyki z pogranicza chemii i biologii. Przedstawiony w pracy problem badawczy jest interesujący i aktualny, a wykorzystane metody spektroskopowe zostały dobrane w sposób właściwy, co umożliwiło skuteczną realizację postawionych celów. Niestety ogólne dobre wrażenie psuje fakt, że uzyskane wyniki badań, właściwie w ogóle nie zostały przedyskutowane ani nie były porównane z podobnymi danymi opisanymi do tej pory w publikacjach naukowych. W związku z tym czytelnik pracy nie może ocenić, które z uzyskanych wyników są nowe, nieznane dotychczas, ani czy Autorka sama jest tego świadoma.

Większość wyników badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej została opublikowana w trzech pracach w czasopismach z listy filadelfijskiej. Ponadto Pani mgr Marta Kuć jest współautorką jeszcze jednej publikacji niezwiązanej tematycznie z pracą

doktorską. Doktorantka prezentowała wyniki swojej pracy w postaci jedenastu posterów na konferencjach międzynarodowych i ogólnopolskich. Pełniła funkcję kierownika lub wykonawcy w kilku projektach badawczych.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa mgr Marty Kuć stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zgodnie z obowiązującymi przepisami ustawowymi dotyczącymi prac doktorskich w pełni spełnia wymogi art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.) oraz w Rozporządzeniu MNiSW z dnia 19.01.2018 r. (Dz. U. z 2018 r., poz. 261) w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora i zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego z jednoznacznym wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Marty Kuć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Małgorzata Broda

Opole, 30 maja 2022 roku