

Kraków, 8 maja 2022

Recenzja pracy doktorskiej

*Wpływ wybranych cząsteczek o właściwościach anestetycznych
na struktury modelowych błon lipidowych*

wykonanej przez Panią Mgr Martę Kuć

pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Marii Rospenk (promotor)
i Pani Dr hab. Katarzyny Cieślik-Boczuli (promotor pomocniczy)

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

Już na wstępie chcę podkreślić, że jestem pod wrażeniem recenzowanej pracy. Motywacja badań, temat, metody, wyniki i zrealizowane cele składają się na przemyślaną, dobrze zaplanowaną, ambitną i bardzo starannie wykonaną pracę doktorską.

Praca ta wpisuje się w nurt badań realizowanych w grupie kierowanej przez Panią Profesor Dr hab. Marię Rospenk od wielu lat, tj. badań oddziaływania modelowej błony komórkowej z lekami. Jako przedmiot badań wybrano tu kolejną grupę anestetyków oraz błony lipidowe, które stanowią powszechnie stosowany w badaniach model biomembran. Optymalizacja dawkowania anestetyków umożliwia redukcję skutków ubocznych wywołanych w trakcie procesu znieczulenia ogólnego i jest to jedno z wyzwań współczesnej anestezjologii. Anestetyki przenikają przez błonę komórkową, jednak dokładny mechanizm ich działania nie jest w pełni jasny. Stąd temat rozprawy skierowany na modelowanie procesu oddziaływania anestetyków z lipidowymi składnikami błony komórkowej jest niezwykle ważny, a zastosowane podejście metodologiczne oparte na kilku technikach spektroskopowych, w tym spektroskopii absorpcyjnej w bliskiej podczerwieni, jest nowatorskie w tym zakresie.

Praca powstała pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Marii Rospenk w Zespole Struktury i Oddziaływań Molekularnych, pod opieką Pani Dr hab. Katarzyny Cieślik-Boczuli, która pełniła rolę promotora pomocniczego, służąc swą ekspertyzą

w zakresie metody spektroskopii molekularnej oraz zaawansowanej analizy chemometrycznej.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Układ pracy jest klasyczny, rozprawa składa się z 11 części i liczy 228 stron. Otwiera ją *Przegląd Literatury*, gdzie opisano błony biologiczne, formy agregacji lipidów, przemiany fazowe lipidów, liposomy, anestezje, metody badawcze układów błonowych i chemometryczne metody analizy danych. Spektroskopowe metody pomiarowe (tj. spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni MIR i NIR, spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR), sondy spinowe) opisano w kontekście badań lipidów, a użycie metod chemometrycznych (analizy czynników głównych, PCA) zostało dobrze uzasadnione.

Rozdział drugi to *Cel Pracy* sformułowany jako zbadanie wpływu wybranych cząsteczek o właściwościach anestetycznych (enfluranu, izofluranu, sewofluranu i halotanu) na struktury modelowe błon lipidowych. Jako obiekt badań wybrano modele bioukładów bilamelarnych o znacznie uproszczonym składzie, ale zachowujące właściwości membran, czyli błony lipidowe w postaci jedno lub kilkuskładnikowych liposomów. To układy zbudowane z molekuł dipalmitoilofosfatydylocholine (DPPC) lub dipalmitoilofosfatydyloglicerolu (DPPG) oraz analogicznych układów z dodatkiem cholesterolu (Chol), dotowane środkami znieczulenia ogólnego.

Część Eksperymentalna to opis stosowanej metodyki, czyli zestawienie odczynników, preparatyka, metody pomiarowe, przygotowanie danych do analizy chemometrycznej oraz charakterystyka parametrów z danych EPR.

Najważniejszy rozdział to *Wyniki i Dyskusja* podzielony na dwie części związane odpowiednio z badaniami metodami FT-IR oraz EPR. Pierwsza część to opis przejść fazowych modelowych układów błonowych badanych w zakresie NIR i MIR. Badania przeprowadzono w sposób systematyczny, najpierw błony były analizowane w postaci jednoskładnikowej, potem z dodatkiem cholesterolu i wreszcie domieszkowane wzrastającym dodatkiem anestetyków wziewnych. W drugiej części *Wyników i Dyskusji* omówiono badania EPR modelowych błon DPPC domieszkowanych wzrastającym dodatkiem anestetyków wziewnych.

Stwierdzono, że pod wpływem środka znieczulenia ogólnego zachodzą zmiany w hydrofobowym rejonie błony lipidowej. Podstawy do tego dała analiza przejść fazowych dwuwarstw lipidowych, związanych ze zmianami konformacyjnymi w obrębie łańcuchów węglowodorowych. Doktorantka wykazała wpływ wszystkich anestetyków na błonę, przy czym najsilniejszym modyfikatorem stanu konformacyjnego błon lipidowych i temperatury głównego przejścia fazowego był

halotan, zaś najsłabszym sewofluran. Pozostałe dwa leki wywołały pośredni efekt modelujący. Doktorantka wykazała, że istotne znaczenie dla siły interakcji między cząsteczkami anestetyków a lipidami tworzącymi modelową błonę ma rodzaj komponentów lipidowych stanowiących budulec dwuwarstwy, który warunkował jej wypadkowy ładunek.

Całość zamyka *Podsumowanie i Wnioski, Streszczenie, Abstract, Bibliografia, Spis rysunków i Spis Tabel*, i ostatecznie *Dorobek naukowy*.

W pracy omówiono bardzo szczegółowo w systematyczny sposób dane spektroskopowe, które przejrzyście przedstawiono na licznych rysunkach i w tabelach. Praca napisana jest bardzo starannie, błędów edytorskich jest tak niewiele, że można je pominąć. Doktorantka doskonale poradziła sobie z opisem i dyskusją zagadnień na pograniczu fizykochemii i biologii, co wymagało od niej zgłębienia obu tych dziedzin i zapoznania się z obszerną literaturą.

UWAGI SZEGÓŁOWE

Kilka pytań do dyskusji, które nasunęły mi się podczas lektury pracy:

- 1/ Na ile uzyskane wyniki mają odniesienie do warunków fizjologicznych oraz badań farmakologicznych? Czy halotan jest najsilniejszym z badanych anestetyków?
- 2/ Czy Doktorantka planuje przeprowadzić badania *in vitro* z użyciem tych związków?
- 3/ Na ile przeprowadzone badania temperaturowe mogą być przydatne w zrozumieniu procesów zachodzących w błonie poddanej działaniu anestetyków?
- 4/ Zespół, w którym pracuje Doktorantka specjalizuje się w spektroskopii chiralooptycznej, która z powodzeniem mogłaby być też wykorzystana do tych badań. Czy Doktorantka planuje takie pomiary? Co ewentualnie by one wniosły?
- 5/ Czy Doktorantka ma pomysł i plany na dalsze badania uwiarygadniające tę silną interakcję między cząsteczkami anestetyków a lipidami tworzącymi modelową błonę?

PODSUMOWANIE

Przedstawiona rozprawa doktorska Pani Marty Kuć w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Praca opisuje szczegółowo zmiany spektroskopowe towarzyszące zmianom strukturalnym lipidów w oddziaływaniu z omawianymi anestetykami, również w warunkach zmienionych temperaturowo. Wyniki i ich analiza opiera się na kompleksowych i komplementarnych pomiarach, i pokazują bogaty warsztat metodyczny Doktorantki. Obok metody spektroskopowej FT-MIR powszechnie stosowanej do badań układów lipidowych, Doktorantka wykorzystwała

rzadziej stosowaną metodę FT-NIR. Pokazała komplementarność tych metod, co jest o tyle ważnym wnioskiem, że analiza metodą NIR próbek zawierających wodę jest łatwiejsza. Doktorantka pokazała, że spektralny zakres nadtonów starannie zanalizowany dostarcza równie wiarygodnych informacji co zakres daktyloskopowy, uważany za tzw. odcisk palca. Odpowiednio dostosowała i zoptymalizowała metodykę pomiarową oraz preparatykę próbek. Analiza danych oparta na metodzie PCA pozwoliła na jednoznaczne przypisania obserwowanych zmian spektralnych.

Doktorantka jest współautorką 3 publikacji o znacznym współczynniku oddziaływania (*Vib. Spectr.* 2016, *Spectrochim Acta A* 2017, *J Mol. Struct.* 2018) tematycznie związanych z pracą doktorską i występuje tam jako pierwszy autor. Obok niej współautorami są tylko obie Panie promotor. To tym bardziej pokazuje, że prace te bez wątplenia są z zakresu pracy doktorskiej. Dodatkowo Doktorantka jest pierwszą autorką jednej publikacji niezwiązanej tematycznie z pracą doktorską (*Chem. Phys.* 2015). Pani Kuć prezentowała wyniki swych badań na kilku konferencjach krajowych i międzynarodowych. Była wykonawcą kilku grantów finansowanych ze źródeł zewnętrznych i kierownikiem dwóch grantów naukowych dla młodych naukowców i uczestników studium doktorskiego na WCh UW.

Podsumowując, uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.; przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, i wnioskuje o dopuszczenie Pani Mgr Marty Kuć do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych badań, szeroki wachlarz metod, kompleksową i dogłębną interpretację prowadzącą do poszerzenia wiedzy na temat oddziaływania wziewnych anestetyków z błoną komórkową wnoszę też o wyróżnienie pracy.

M. Barańska