



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I KOMPOZYTÓW

Prof. dr hab. inż. Elżbieta PAMUŁA

Kraków 10 maja 2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Dominika DRABIKA
pt. *„Development of methods for determination of mechanical
parameters of lipid membranes”*
zrealizowanej pod kierunkiem Promotora pracy
Prof. dr. hab. inż. Marka Langnera

Recenzja została opracowana na podstawie decyzji
Komisji ds. Naukowych w Dyscyplinie Inżynieria Biomedyczna
Politechniki Wrocławskiej z dnia 2 kwietnia 2020
oraz zlecenia Przewodniczącej Komisji
Prof. dr. hab. inż. lek. med. Haliny Podbielskiej
z dnia 6 kwietnia 2020

W ostatnich latach coraz większą rolę przypisuje się tłuszczom w kontekście nie tylko substancji zapasowych w organizmach żywych, czy opisu różnorodnych reakcji biologicznych, ale również właściwości błon biologicznych. Samoczynnie powstające agregaty lipidów, takie jak micelle, monowarstwy, dwuwarstwy mają różnorodną budowę i właściwości, które zależą m.in. od rodzaju, składu chemicznego i struktury cząsteczek lipidów a także od budowy i właściwości środowiska zewnętrznego. Szczególnie istotne wydaje się pozyskanie głębszej wiedzy na temat budowy i właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej, co dobrze wpisuje się w intensywnie rozwijającą się nową dyscyplinę naukową, mianowicie mechanobiologię. Dyscyplina ta koncentruje się na tym, w jaki sposób obciążenia i zmiany właściwości mechanicznych komórek wpływają na ich wzrost i różnicowanie, a w konsekwencji na



Wimic

Akademia Górniczo-Hutnicza | Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Biomateriałów i Kompozytów

al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków, tel. +48 12 617 44 48, fax. +48 12 617 33 71
e-mail: epamula@agh.edu.pl, www.ceramika.agh.edu.pl
Regon: 000001577, NIP: 675 000 19 23

prawidłowy bądź patologiczny stan tkanek i narządów. Głównym wyzwaniem mechanobiologii jest zrozumienie mechanotransdukcji, tj. mechanizmów molekularnych, za pomocą których komórki wykrywają i reagują na bodźce mechaniczne. Ponieważ błony komórkowe oprócz białek zbudowane są przede wszystkim z cząsteczek lipidowych, wiedza na temat właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej jest niezbędna do lepszego zrozumienia procesów mechanotransdukcji. Pozyskana wiedza w zakresie mechanicznych podstaw regulacji procesów biologicznych może zostać wykorzystana do projektowania zaawansowanych biomateriałów dla inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej, a co za tym idzie wpłynąć korzystnie na rozwój szeroko rozumianej inżynierii biomedycznej. Biorąc powyższe pod uwagę, chciałbym stwierdzić, że tematyka podjęta przez Doktoranta dotycząca opracowania metod doświadczalnych i numerycznych oceny właściwości mechanicznych dwuwarstwy lipidowej jest w pełni uzasadniona.

Praca została zredagowana w języku angielskim, opiera się na trzech opublikowanych artykułach, w których doktorant jest jednocześnie pierwszym autorem jak i autorem korespondencyjnym. Praca liczy w sumie 89 stron. Na początku znajduje się streszczenie pracy w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów użytych w pracy, w punktach przedstawiony został cel rozprawy oraz krótki tekst odnośnie powiązania tematyki rozprawy z dyscypliną inżynierii biomedycznej. Następnie w Rozdziale 1 na 25 stronach Autor zaprezentował przegląd piśmiennictwa wprowadzający do tematu rozprawy, przygotowany na podstawie 136 pozycji literaturowych. W dalszej części zamieszczone są trzy artykuły: pierwszy opublikowany w *Chemistry and Physics of Lipids* w 2018 r, drugi w *Biochimica et Biophysica Acta* z 2016 r i trzeci w czasopiśmie *Langmuir* opublikowany *on-line* w marcu 2020. Do każdego z artykułów dołączone są dodatkowe dane (*supplementary files*). Na końcu dysertacji podana jest informacja, że badania były finansowane z dwóch projektów NCN i jednego projektu

sfinansowanego przez Wrocławskie Centrum Sieciowo-Superkomputerowe Politechniki Wrocławskiej.

W Rozdziale 1 – wstępie literaturowym – Autor opisał, co to jest mechanobiologia i omówił rodzaje lipidów tworzących błony biologiczne. Następnie skupił się na modelach błon biologicznych takich jak liposomy, dwuwarstwy lipidowe tworzone na stałych substratach i monowarstwy Langmuira, a następnie krótko opisał przejścia fazowe w dwuwarstwach. Rozdział ten dobrze wprowadza w tematykę dysertacji, jednak odnosi się wrażenie, że autor za mało czasu poświęcił na korektę językową tekstu. Z obowiązku recenzentki chcę zwrócić uwagę na takie błędy jak np. w pierwszym zdaniu na str. 9 jest napisane „*forces has been recognised*” (powinno być „*have been*”), czy pod koniec pierwszego akapitu „*cells can adopt various of shapes*” (Autor miał chyba na myśli „*cells can take differnt shapes*” albo „*variety od shapes*”), albo na początku drugiego akapitu „*while membranes varies in composition*” (powinno być „*membranes vary in composition*”). Są to błędy ortograficzne i składniowe, ale można zrozumieć, co autor miał na myśli. Jednakże obok wymienionych pojawiają się błędy merytoryczne, jak np. na str. 13 widnieje „*protein absorptions*”, zamiast „*protein adsorption*”, na str. 14 „*surface pressure change in function of lipid surface area*”, zamiast „*surface tension change as a function of lipid surface area*” czy też na str. 14 „*different species of compounds*” zamiast „*different types of components/ingredients*”.

W dalszej części Rozdziału 1 Autor opisał modele mechaniczne dwuwarstwy lipidowej a następnie techniki eksperymentalne pozwalające na ocenę właściwości mechanicznych błon biologicznych, klasyfikując je na takie, które analizują fluktuacje termiczne, techniki, które analizują deformacje mechaniczne i techniki rozpraszania neutronów lub promieniowania X. Podobnie jak w poprzednich podrozdziałach i tutaj występują drobne błędy ortograficzne i składniowe, których już nie chcę przytaczać, poza jednym przewijającym się w całej dysertacji (oprócz ostatniego artykułu opublikowanego w czasopiśmie *Langmuir*): chodzi o wyrażenie

„in case” (w razie czegoś, na wypadek czegoś, np. jakiegoś zdarzenia niepożądanego) zamiast wyrażenia „in the case” (w przypadku czegoś, np. w przypadku danej próbki). Tak jak poprzednio te niedociągnięcia nie przeszkadzają aż tak w podążaniu za wywodami Doktoranta.

Pod koniec Rozdziału 1 Autor na jednej stronie (str. 29) przedstawił podsumowanie i perspektywy dalszych badań. Jest to moim zdaniem najlepiej zredagowany fragment dysertacji, bardzo dobrze podsumowujący wyniki badań Doktoranta w zakresie otrzymywania modeli błon lipidowych i opracowania nowych metod oceny ich właściwości mechanicznych, ponadto nakreślający kierunki nowych planowanych eksperymentów, np. za pomocą mikroskopii sił atomowych, które są perspektywiczne z punktu widzenia badań błon lipidowych. Rozdział ten świadczy o umiejętności Doktoranta do syntetycznego spojrzenia na uzyskane wyniki i wyciągania wiarygodnych wniosków naukowych.

Rozdział 2, tj. artykuł opublikowany w *Chemistry and Physics of Lipids*, 212, 2018, 88-95, dotyczy opracowania metody formowania specjalnego rodzaju liposomów – gigantycznych jednowarstwowych pęcherzyków lipidowych (GUV – ang. *giant unilamellar vesicles*), które w kolejnych dwóch rozdziałach są użyte, jako modele błon lipidowych. W pracy badano wpływ takich parametrów jak czas formowania, stan powierzchni elektrod, częstotliwość i napięcie prądu na wielkość liposomów i efektywność procesu formowania. Badania przeprowadzone za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej wykazały, że na otrzymywanie liposomów największy wpływ mają parametry prądowe (napięcie i częstotliwość) a nie czas prowadzenia procesu. Jest to wynik o tyle ważny, że pozwala na skrócenie czasu otrzymywania liposomów o zdefiniowanych właściwościach, co ma duże znaczenie praktyczne, np. w kontekście wytwarzania przemysłowego liposomowych nośników leków. Liposomy GUV z racji swojej wielkości (5 – 200 μm) i budowy najbardziej zbliżonej do budowy błon

komórek eukariotycznych stanowią też doskonały model do badań właściwości nanomechanicznych błon.

Rozdział 3, tj. artykuł opublikowany w *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858, 2016, 244-252, dotyczy opracowania metod doświadczalnych mających na celu wyznaczenia parametrów mechanicznych błon lipidowych za pomocą analizy drgań termicznych (spektroskopia *flicker-noise*) oraz numerycznej analizy fluktuacji pęcherzyka lipidowego z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej. Przedmiotem badań były liposomy typu GUV, które zostały wyznakowane fluorescencyjnie, aby móc obserwować je za pomocą skanującej mikroskopii konfokalnej (ang. *confocal laser scanning microscopy*) i mikroskopii z wirującym dyskiem (ang. *spinning disc microscopy*). Za cel Autor postawił sobie ocenę wpływu techniki akwizycji obrazu na wyniki sztywności błony lipidowej wytworzonej z dwóch lipidów (POPC i DOPC) w zależności od ciśnienia osmotycznego. Badania wykazały, że oba podejścia pozwalają na wyznaczenie współczynnika sztywności błony komórkowej a uzyskane wyniki były do siebie zbliżone. Ponadto stwierdzono, że sztywność błony DOPC w wodzie jest mniejsza niż POPC, a parametry sztywności błon ulegają dodatkowo obniżeniu w roztworze sacharozy. Ponieważ opracowana metoda badawcza opiera się na wykorzystaniu sond fluorescencyjnych nasuwa się pytanie o jej ograniczenia. Czy Doktorant w czasie obrony mógłby wypowiedzieć się na ten temat i zaproponować inne metody, które mogłyby zweryfikować uzyskane wyniki?

Rozdział 4, tj. artykuł opublikowany *on-line* w czasopiśmie *Langmuir*, dnia 16 marca 2020, dotyczy badań modelowych dwuwarstw lipidowych (w liposomach typu GUV) zbudowanych z czterech różnych lipidów: POPC, DMPC, DPPC, DSPC, oraz HSPC, czyli mieszaninie DPPC i DSPC o składzie odpowiednio 11,4% i 88,6%. Badanie lipidy różniły się między sobą temperaturą przejścia fazowego a co za tym idzie wytworzone z nich dwuwarstwy lipidowe

w liposomach miały budowę krystaliczną albo amorficzną, albo żelową albo tzw. strukturę falistego żelu (ang. *rippled-gel phase*). Zaproponowane przez Doktoranta metody badawcze pozwoliły na wyznaczenie nie tylko współczynnika sztywności błon, co było przedmiotem poprzedniego artykułu wchodzącego w cykl doktoratu, ale też grubości membrany, profilu gęstości, czy powierzchni przypadającej na cząsteczkę lipidu. Podkreślenia wymaga, że wyniki badań sztywności otrzymane za pomocą metody doświadczalnej i obliczeniowej są spójne. Artykuł jest bardzo dobrze napisany i zawiera szereg ciekawych spostrzeżeń. Na podkreślenie zasługują wyniki, że w przypadku dwuwarstw zbudowanych z jednego rodzaju lipidu, współczynnik sztywności ulegał obniżeniu ze wzrostem temperatury przejścia fazowego danego lipidu. Intuicja zaś podpowiada, że powinno być odwrotnie. Doktorant potrafił jednak wyjaśnić to zjawisko, stawiając hipotezę, że warstwy lipidowe składają się z wielu sztywnych obszarów określonych mianem łatek (ang. *patches*), więc lokalne próbkowanie wykazuje stosunkowo dużą sztywność dwuwarstwy. Sprawa się jeszcze bardziej komplikuje w przypadku mieszanin lipidów, np. dwuwarstwa z HSPC miała współczynnik sztywności znacznie niższy niż zmierzony dla dwuwarstw wykonanych z jednego rodzaju lipidów składowych. Prace prowadzone przez Doktoranta rzucają więcej światła na zagadnienia dotyczące właściwości mechanicznych dwuwarstw lipidowych, co ma duże znaczenie z punktu widzenia zarówno nauk podstawowych jak i stosowanych. Mam jedno pytanie do dyskusji. Badania liposomów prowadzono w temperaturze 22 °C. Czy nie powinno się takich badań prowadzić w temperaturze 37 °C, która jest temperaturą fizjologiczną, w kontekście np. wykorzystania opracowanych liposomów, jako nośników leków?

Podsumowując chciałabym podkreślić, że rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Dominika Drabika zawiera bogaty materiał doświadczalny, należycie przedyskutowany i już opublikowany w trzech renomowanych czasopismach.

Przytoczone przeze mnie w recenzji uwagi krytyczne są punktem wyjścia do dyskusji naukowej albo są natury edytorskiej i nomenklaturowej. Nie wpływają one na moją wysoką ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska, tak ze względu na wartości naukowe, znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz wysoki poziom warsztatu naukowego, spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w dyscyplinie inżynieria biomedyczna w myśl obowiązującej ustawy i w związku z tym wnoszę o jej przyjęcie oraz dopuszczenie Pana mgr. inż. Dominika Drabika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

