

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII  
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

[www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii](http://www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii)

Wrocław, 21.04.2020

Dr hab. Aleksander Czogalla

Kierownik

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Dominika Drabika pod tytułem  
"Development of methods for determination of mechanical parameters of lipid  
membranes" ("Rozwój metod doświadczalnych do wyznaczania parametrów  
mechanicznych błon lipidowych")**

Zależności pomiędzy mechanicznymi właściwościami komórek oraz siłami generowanymi przez elementy wewnątrzkomórkowe lub działającymi na komórki z zewnątrz objawiają się nam jako kluczowe dla utrzymywania ich prawidłowego funkcjonowania. Najważniejszą barierą mechaniczną każdej komórki żywej jest błona komórkowa, właściwości której w przeważającym stopniu determinowane są zdolnością lipidów do tworzenia struktur lamelarnych. W ostatnich latach jesteśmy świadkami prawdziwej eksplozji doniesień naukowych na temat różnorodności lipidów tworzących błony biologiczne, ich funkcji jako modulatorów i przekaźników w procesach sygnałowych oraz bezpośredniego wpływu fizykochemicznych właściwości dwuwarstwy lipidowej na różnorodne procesy komórkowe. Z drugiej jednak strony, nasza wiedza na temat molekularnych mechanizmów zawiadujących konwersją mechanicznych właściwości błony w odpowiedź fizjologiczną komórki wciąż pozostaje w dużym stopniu niekompletna. By zmienić taki stan rzeczy konieczne jest tworzenie nowych narzędzi pozwalających na badania układów biologicznych w ściśle kontrolowanych warunkach, co jest niezbędne do jednoznacznej interpretacji obserwowanych zjawisk.

Przedstawiona do oceny dysertacja naukowa wychodzi naprzeciw tym potrzebom. Jej Autor postanowił opisać ilościowo mechaniczne właściwości dwuwarstw lipidowych, w zależności od ich składu lipidowego, z wykorzystaniem zarówno podejścia eksperymentalnego jak i symulacji dynamiki molekularnej. Chociaż podobne podejścia były już wcześniej stosowane w analizach poszczególnych parametrów mechanicznych błon, do tej pory nie pozwoliły one na uzyskanie całościowego i jednoznacznego opisu wspomnianych zagadnień. Badania Autora rozprawy doktorskiej, które w sposób

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**

ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII  
ul. Fryderyka Joliot-Curie 12a  
50-383 Wrocław  
tel. +48 71 375 64 18

[www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii](http://www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii)

konsekwentny podzielone są na trzy etapy obejmujące rozwój metod pomiarowych i analitycznych, weryfikację ich poprawności oraz zastosowanie proponowanego podejścia naukowego do rozwiązania zagadnienia naukowego, pozwalają w dużym stopniu przybliżyć się do tego celu.

Autor pracy doktorskiej przedstawił swoje dokonania w postaci zestawu trzech, ściśle powiązanych ze sobą artykułów eksperymentalnych opublikowanych w czasopismach o uznanej międzynarodowej renomie (sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor* przekracza 10): *Chemistry and Physics of Lipids*, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* oraz *Langmuir*. Artykuły te stanowią wycinek bogatego (jak na ten etap kariery naukowej) dorobku Doktoranta, obejmującego w sumie dziewięć prac eksperymentalnych, wśród których aż w czterech jest on pierwszym (i jednocześnie korespondującym) autorem. Doniosłe znaczenie tego dorobku znajduje swoje odzwierciedlenie nie tylko w sumarycznym współczynniku oddziaływania IF czasopism w których został opublikowany przekraczającym 28, ale także w tym, że został on już zauważony w środowisku naukowym, o czym świadczy sumaryczna ilość cytowań wynosząca 32 (wg bazy Scopus na dzień sporządzenia recenzji). Ponadto, Doktorant wielokrotnie przedstawiał wyniki swoich badań na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. Warto podkreślić, że Doktorant z sukcesem aplikował o wsparcie finansowe swoich badań, co zaowocowało uzyskaniem dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki w ramach programów Preludium i Etiuda. We wszystkich artykułach składających się na rozprawę doktorską mgr inż. Dominik Drabik jest pierwszym współautorem oraz pełni funkcję autora korespondującego. Dołączone oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w powstaniu tych publikacji, polegającą na przeprowadzeniu większości eksperymentów i analizie wyników, udziale w planowaniu eksperymentów oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji.

Rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim, gdzie na 90 stronach oprócz wspomnianych powyżej publikacji, Autor prezentuje streszczenie (także w języku polskim), cel oraz zarys pracy opatrzonej odnośnikami do najważniejszych i najbardziej aktualnych pozycji literaturowych (w sumie 136 pozycji w tym 19 opublikowanych w ciągu ostatnich czterech lat). Wspomniane elementy pracy stanowią wartościowe opracowanie pozwalające na wprowadzenie czytelnika w meritum publikacji stanowiących rdzeń dysertacji. Jakkolwiek ta część pracy generalnie zasługuje na wysoką ocenę, miejscami precyzja przekazu cierpi na skutek chęci skondensowania przekazywanych informacji.

**WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII**ZAKŁAD CYTOBIOCHEMII  
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław

tel. +48 71 375 64 18

[www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii](http://www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-cytobiochemii)

Sądzę, że nie ma potrzeby wyszczególniania wszystkich błędów edytorskich bądź typograficznych (jak na przykład niekompletna lista skrótów – brak rozwinięcia np. HSPC, niespójności w oznaczaniu lokalizacji wiązania podwójnego w łańcuchach acylowych, tytuł podrozdziału na str. 24 nieadekwatny do treści), jednak kilka przedstawionych poniżej kwestii wymaga sprostowania bądź uściślenia, szczególnie, że praca ta z pewnością stanie się źródłem informacji i inspiracji dla innych naukowców oraz studentów. Przede wszystkim w zbytnim uproszczeniu opisano mezomorfizm liotropowy lipidów – niektóre cząsteczki, jak np. lizofosfolipidy lub cholesterol nie tworzą z reguły stabilnych struktur lamelarnych. Zbytnim uproszczeniem jest także stwierdzenie, że wszystkie fosfatydylocholiny i sfingomieline występują w egzocytoplazmatycznej monowarstwie lipidowej błony – owszem, w zależności od typu komórek jest zarysowana asymetria (szczególnie dla sfingomieline) jednak nigdy nie jest ona absolutna (np. Fujimoto&Parmryd 2017 Front. Cell Dev. Biol.). Nie jest też prawdą, że czas życia (a ściślej mówiąc półtrwania) białek integralnych to 2-5 dni, gdyż w rzeczywistości może być znacznie krótszy (kilkadziesiąt minut) lub dłuższy (np. Herve et al. 2007 J Membr Biol). Za pomocą ryciny 1.1 (prezentującej w domyśle błonę plazmatyczną komórki z wyszczególnioną stroną cytoplazmatyczną) Autor sugeruje, że tylko niektóre białka przezbłonowe są glikozylowane, podczas gdy w rzeczywistości niemal wszystkie ulegają tego typu modyfikacjom. Poza tym nie definiuje różnicy pomiędzy przedstawionymi na tej rycinie białkami peryferyjnymi („peripheral protein”) a białkami powierzchniowymi („surface protein”) – czy taki podział jest uzasadniony? Czy w tym kontekście wymienienie tzw. „structural proteins” jako elementów błonowych należy traktować jako błąd edytorski? Na rycinie 1.2 w cząsteczce sfingomieline błędnie zaznaczony jest element strukturalny pochodzący od sfingoizyny, poza tym w tej cząsteczce pojawia się także trójwartościowy atom węgla. Należałoby także zaznaczyć, że struktura tzw. beta-helisy klasyfikowana jest (także przez autorów artykułu cytowanego pod pozycją 25) jako struktura trzeciorzędowa, stąd trudno porównywać jej geometrię z klasyczną drugorzędową strukturą typu alfa-helisa. Trudno się zgodzić także ze stwierdzeniami, że pęcherzyki lipidowe mogą być wykorzystywane jedynie do obrazowania lub metod jakościowych (co np. z zastosowaniem metodologii Autora, spektroskopii korelacji fluorescencji, interferometrii biowarstwowej i termoforezy mikroskalowej z użyciem liposomów – np. Thomas et al. 2015 BBA-Biomembranes, Wallner et al. 2017 Colloids Surf. B, van den Bogaart et al. 2012 J Biol Chem), a praca z błonami podpartymi (ang. supported lipid bilayers) wyklucza analizę krzywizny błony (np. Yu&Groves 2010 Med. Biol Eng Comput). Sprostowania wymaga także nomenklatura dot. badań monowarstw

lipidowych: prawidłowym określeniem elementu sensora ciśnienia powierzchniowego jest płytka Wilhelmięgo, zgodnie z oryginalną publikacją z 1863 roku autorstwa Ludwiga Wilhelmięgo.

Badania, które przeprowadził mgr inż. Dominik Drabik w ramach realizacji projektu doktorskiego mają nie tylko dużą wartość poznawczą, ale są także bardzo dobrym przykładem właściwie ukierunkowanych prac dążących do rozwoju metodologii badań. Można je podzielić na trzy główne etapy: pierwszy obejmujący szczegółową analizę i optymalizację procesu przygotowywania modelowych systemów błonowych, drugi polegający na rozwinięciu techniki flicker-noise pozwalającej na analizę spontanicznych drgań termicznych i wyznaczenie współczynnika elastyczności błony oraz trzeci polegający na rozszerzeniu metodologii badań nad właściwościami mechanicznymi błon o symulacje dynamiki molekularnej i narzędzia obliczeniowe pozwalające na analizę wieloparametrową. Kolejność przedstawionych w dysertacji artykułów naukowych odpowiada tym etapom, przy czym nie jest to kolejność chronologiczna. Nie mam jednak wątpliwości, że każda z prac stanowi samodzielną całość i wnosi swoją treścią wiele cennych informacji do światowej nauki. Jest to potwierdzone nie tylko uznaniem recenzentów w procesie publikacyjnym, ale także dynamicznym przyrostem cytowań tych publikacji.

Pierwsza praca składająca się na omawiany cykl to przykład podejścia do optymalizacji procesu elektroformacji jednoskładnikowych gigantycznych pęcherzyków jednowarstwowych (GUV) z użyciem prądu zmiennego przyłożonego do elektrod platynowych w roztworach wodnych o niskiej konduktywności. Metoda ta jest znana już od ponad 30 lat i bardzo szeroko stosowana w laboratoriach na całym świecie, jednak procesy odpowiedzialne za tworzenie się pęcherzyków nie do końca są poznane, co utrudnia jednoznaczne określenie najlepszych parametrów. Publikacja dobrze wpisuje się w bogato reprezentowany nurt poszukiwań optymalnych warunków tworzenia pęcherzyków przynosząc bardzo interesujące i użyteczne obserwacje. Zasadniczym pytaniem, jakie rodzi się po lekturze artykułu jest to, czy zaproponowany przez autorów protokół elektroformacji można uważać za uniwersalny (tzn. czy można go odnieść do bardziej złożonych mieszanin lipidowych lub lipidów o wyższym stopniu nasycenia łańcuchów acylowych niż stosowanych przez autorów, oczywiście z uwzględnieniem temperatury głównego przejścia fazowego). Innym zagadnieniem, które wymaga komentarza jest kwestia podatności lipidów (szczególnie tych zawierających wiązania



podwójne w łańcuchach acylowych) na procesy utleniania, które mogą być znacząco przyspieszone w warunkach elektroformacji (np. Breton et al. 2015 J Membrane Biol). Czy skrócenie procesu elektroformacji do 1-2 godzin (zgodnie z niektórymi publikowanymi wcześniej protokołami) nie byłoby wystarczająca do utworzenia pęcherzyków o pożądanym parametrach przy ograniczeniu utleniania lipidów?

Kolejna publikacja zawarta w cyklu dotyczy zastosowania opartej o fluorescencję spektroskopii fluktuacji błon pęcherzyków GUV do ilościowego opisu elastyczności błon zbudowanych z różnych lipidów. Wysoka wartość tej pracy wynika w głównej mierze z porównania i wzajemnej walidacji różnych metod akwizycji oraz obróbki obrazu jak również oszacowania wpływu właściwości lipidowych sond fluorescencyjnych oraz ośrodka wodnego otaczającego badane błony na jakość i zbieżność otrzymywanych wyników. Podejście eksperymentalne zaproponowane w tym artykule otwiera sporo nowych możliwości badania niehomogennych błon lub pęcherzyków oddziałujących z innymi komponentami, co zostało wykorzystane m.in. przez autorów w innych opublikowanych przez nich badaniach. Interesującym z praktycznego punktu widzenia jest zagadnienie doboru grubości warstwy konfokalnej: w omawianej pracy oba systemy akwizycji pracowały w podobnym zakresie (0,85 i 1,38 um odpowiednio dla mikroskopu z wirującym dyskiem i dla systemu skanującego), czy zwiększenie wartości tego parametru jest możliwe bez uszczerbku dla dokładności pomiarów? Czy jest jakieś optimum względem wielkości (średnicy) analizowanych pęcherzyków?

W ostatnim artykule zamieszczonym w pracy doktorskiej mgr inż. Dominik Drabik wraz z współautorami wykorzystuje prezentowany wcześniej warsztat eksperymentalny znacznie go poszerzając o symulacje dynamiki molekularnej zastosowanej względem niewielkich pęcherzyków lipidowych (o średnicy 20 nm). Wybór tak małych pęcherzyków o bardzo dużej krzywiznie błony, które oscylują na granicy stabilności termodynamicznej (Israelachvili et al. 1977 BBA-Biomembranes) budzi pewne wątpliwości. Są one jednak przynajmniej częściowo zniwelowane dzięki równoległej analizie układów planarnych traktowanych jako układy referencyjne. Od razu nasuwa się pytanie czy w opinii Autora można byłoby spodziewać się uzyskania nieco bardziej zbieżnych z danymi eksperymentalnym wyników uzyskanych dzięki dłuższym symulacjom ( $>>10$  ns) pęcherzyków o większej średnicy? W ujęciu całościowym praca ta może być traktowana jako wyznacznik nowych kierunków badań nad właściwościami mechanicznymi błon lipidowych. Podjęty w niej wątek naukowy, polegający na porównaniu ogólnych

właściwości strukturalnych (takich jak grubość dwuwarstwy i powierzchnię przypadającą na cząsteczkę lipidu) oraz właściwości mechanicznych (tj. elastyczności i ściśliwości) dwuwarstw lipidowych będących w różnych fazach, jest niezwykle istotne z punktu widzenia możliwości pełnego opisu zachowania się błon zawierających lipidy w fazie stałej, gdzie topologia błony oraz odkształcenia ścinające mogą odgrywać znaczącą rolę.

Reasumując, cykl publikacji stanowiący podstawę recenzowanej pracy doktorskiej stanowi oryginalny i cenny wkład w rozwój reprezentowanej przez Autora dziedziny naukowej. Wraz z pozostałym dorobkiem naukowym świadczą one nie tylko o pracowitości Doktoranta, ale także o jego dojrzałości naukowej odzwierciedlającej się w umiejętności krytycznej interpretacji danych i wyciągania właściwych wniosków. Chciałbym przy okazji zainspirować Autora do spięcia swojego dotychczasowego dorobku klamrą w postaci artykułu przeglądowego, który byłby okazją nie tylko do podsumowania wszystkich wyników, ale także do zbudowania na ich podstawie nowych intrygujących hipotez.

W moim przekonaniu przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Dominika Drabika spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone przez obowiązującą ustawę o stopniach i tytułach naukowych, a dorobek naukowy Doktoranta w pełni uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora w dyscyplinie naukowej inżynieria biomedyczna. Niniejszym wnoszę o dopuszczenie mgr. inż. Dominika Drabika do dalszych etapów przewodu doktorskiego, a ze względu na wysoką wartość naukową pracy jak i bogaty dorobek publikacyjny Doktoranta proponuję jej wyróżnienie.

  
dr hab. Aleksander Czogalla