



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 23 grudnia 2024 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik
pt. „On discovering new facets of cholesterol in model cell membranes”**

Niezwykłe dynamiczny rozwój instrumentalnych technik badawczych, jakiego byliśmy świadkami przez ostatnich kilka dekad, przekładał się bezpośrednio na możliwości badawcze w obszarze nauk przyrodniczych i technicznych. Wiele spektakularnych rezultatów naukowych popierających tę tezę moglibyśmy przywołać w obszarze związanym bezpośrednio z badaniem właściwości strukturalnych, dynamicznych oraz funkcjonalnych błon lipidowych, zarówno w układach modelowych jak i naturalnych. Jedno z niezwykle ważnych wyzwań poznawczych w tym obszarze badawczym wiązało się z obecnością steroli w membranach, w szczególności cholesterolu w komórkach zwierzęcych. Przypominam sobie, jak na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci problem wpływu cholesterolu na właściwości strukturalne oraz dynamiczne membran lipidowych obwieszczany był wielokrotnie jako w pełni poznany, co nie przeszkadzało formułowaniu wciąż nowych, otwartych problemów poznawczych

dotyczących tego problemu. Na fakt, iż problem ten jest wciąż żywy oraz ważny wskazuje dobitnie rozprawa doktorska mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik, w której problematyka interakcji cholesterolu z lipidami w dwuwarstwach podjęta została z zastosowaniem nowatorskiego podejścia eksperymentalnego umożliwiającego wnioskowanie o mechanizmach molekularnych na poziomie pojedynczych cząsteczek. W moim odczuciu, pomimo klasycznego problemu, podjęte badania są nowatorskie oraz cenne z poznawczego punktu widzenia, co czyni analizowaną pracę doktorską nie tylko wysoce interesującą, ale również bardzo ważną.

Praca doktorska przygotowana została pod kierunkiem prof. Łukasza Piątkowskiego w Instytucie Fizyki Politechniki Poznańskiej. Podstawę tezy doktorskiej stanowią wyniki naukowe ogłoszone w trzech oryginalnych artykułach naukowych, których kopie zamieszczone zostały jako integralne części rozprawy. Fakt, iż we wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką oraz analiza zamieszczonych oświadczeń współautorów pozwala wnioskować o kluczowej roli indywidualnej aktywności naukowej mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik w uzyskaniu prezentowanych badań. Tematyka tych prac oraz ich sekwencja wpisuje się w spójną formułę bardzo dobrze odzwierciedlającą tematykę pracy doktorskiej, określoną jej tytułem. Pierwsza z prezentowanych prac (opublikowana w J. Phys. Chem. B. w roku 2023) prezentuje nowe spojrzenie na interpretację wyników uzyskiwanych przy zastosowaniu popularnego znacznika fluorescencyjnego Laurdanu w odniesieniu do modelowych dwuwarstw lipidowych. Wyniki prezentowane w ramach tego artykułu pokazują dobitnie, iż zaawansowana analiza otrzymywanych rezultatów spektroskopowych umożliwia formułowanie wniosków dotyczących stopnia uwodnienia membrany w kontekście składu fazy lipidowej, w szczególności frakcji cholesterolu. W kolejnej pracy (opublikowanej w J. Phys. Chem. Letters w roku 2024) wprowadzone wcześniej podejście wykorzystane zostało do precyzyjnej analizy relacji pomiędzy uwodnieniem dwuwarstwy a dystrybucją cząsteczek cholesterolu pomiędzy domenami charakteryzującymi się radykalnie różną płynnością. W trzeciej pracy (opublikowanej w J. American Chemical Society w roku 2024) przedstawione zostały

wyjątkowej precyzji wyniki, uzyskane dzięki zastosowaniu spektroskopii generacji sumy częstotliwości, wskazujące na istotny wpływ cholesterolu na organizację molekularną warstwy hydratacyjnej oddziałującej bezpośrednio z rejonem głów polarnych dwuwarstwy lipidowej. Tak jak już wspomniałem powyżej, uzyskane wyniki badawcze prezentowane w ramach wszystkich trzech artykułów są w mojej opinii bardzo interesujące oraz ważne, zaś ich ranga naukowa wydaje się rosnać z pracy na pracę!

Pozwolę sobie jeszcze odnieść się bezpośrednio do formy samej rozprawy doktorskiej, która poza rangą naukową uzyskanych wyników, stanowi w mojej opinii również istotny element całego postępowania doktorskiego. Rozprawa zredagowana została w języku angielskim i pomimo iż nie podejmuję się recenzji językowej strony pracy nadmienić chciałbym, iż czyta się ją z ogromną lekkością, a nawet przyjemnością. Formalnie, rozprawa wydaje się być zredagowana w oparciu o, nie tyle typowy co logiczny układ uwzględniający między innymi: spis treści, streszczenia w językach polskim i angielskim, zestawienie projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych w ramach których realizowane były zadania badawcze projektu doktorskiego, wykaz skrótów i oznaczeń oraz wprowadzenie („Preface”). Kolejne treści prezentowane w ramach rozprawy zamieszczone zostały w ramach numerowanych rozdziałów, z których pierwszy, zatytułowany „Introduction” zawiera podrozdział pt. „Motivation”, w ramach którego sformułowane zostały zarówno strategiczne jak i cząstkowe cele projektu doktorskiego. Rozdział 1. zawiera również zestawienie artykułów stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Rozdział 2. poświęcony został wprowadzeniu w tematykę błon komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem składników fazy lipidowej oraz układów modelowych stosowanych powszechnie w badaniach fizycznych. Rozdział 3. poświęcony został prezentacji tematyki związanej z wpływem cholesterolu na właściwości strukturalne i dynamiczne membran, zaś rozdział 4. różnorodnym aspektem molekuł H_2O , począwszy od struktury cząsteczek do ich kooperatywnego zachowania w formowaniu fazy wodnej oraz otoczki hydratacyjnej membran. Znaczną wartość, również w aspekcie dydaktycznym dla

młodych adeptów nauki, dostrzegam w rozdziale 5., w ramach którego zaprezentowane zostały zagadnienia dotyczące spektroskopii molekularnej oraz obrazowania, w szczególności opierającego się na analizach fluorescencji oraz spektroskopii generacji sumy częstotliwości. W ramach kolejnych rozdziałów 6., 7. i 8. rozprawy prezentowane są oryginalne artykuły badawcze, omówione już pokrótce przeze mnie powyżej, wraz z materiałami dodatkowymi („Supporting information”) zamieszczonymi na stronach internetowych czasopism. Ważną, integralną część prezentowanych treści stanowią interpretacje wyników oraz ich dyskusja, przeprowadzona w ramach opublikowanych artykułów, która dodatkowo znalazła swoje odbicie w ramach rozdziału 9. rozprawy doktorskiej zatytułowanego „Summary”. W ramach rozdziału 10. zatytułowanego „Scientific achievements” Doktorantka zamieściła szereg zestawień, dotyczących między innymi, odbytych staży, wszystkich publikacji (w liczbie 18!), udziału w konferencjach oraz uzyskanych stypendiów i otrzymanych nagród z tytułu swojej aktywności naukowej. Do tej długiej i chlubnej listy dopisać można jeszcze uzyskane ostatnio prestiżowe wyróżnienie-stypendium w ramach programu Kobiety w Nauce L’Oreal. W ramach końcowego rozdziału pt. „Bibliografia” zestawione zostały 184 pozycje cytowanego piśmiennictwa. Rozprawę zamykają kopie oświadczeń współautorów. Do analizy formalnych aspektów rozprawy doktorskiej mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik chciałbym dodać jeszcze swoją bardzo wysoką ocenę pomysłowości, klarowności i niezwykle wysokiego poziomu artystycznego grafik, zarówno tych zamieszczonych w ramach opublikowanych artykułów, jak i w ramach rozdziałów wstępnych rozprawy. Razem z warstwą językową, piękna szata graficzna czyni lekturę przedmiotowej rozprawy nie tylko wartościową w aspekcie naukowym, ale również dostarcza przeżyć estetycznych!

Tak wieloaspektowe i nowatorskie podejście, jakie odnajduję w pracy doktorskiej mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik, nie tylko poszerza nasze horyzonty naukowe, ale pobudza również ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Szczególnie interesującym wynikiem rozprawy wydaje się być ukazanie zależności przyczynowo skutkowej stopnia uwodnienia błony lipidowej oraz redystrybucji cholesterolu modyfikującego krytycznie płynność membran w obrębie domen. W przypadku błon komórkowych grzybów funkcję analogiczną do cholesterolu pełnią cząsteczki ergosterolu, bardzo zbliżone strukturalnie. Można się więc spodziewać aktywności tych samych bądź zbliżonych mechanizmów molekularnych. Problem bardziej złożony oraz interesujący, pojawia się, w mojej opinii, w komórkach niektórych bakterii, w tym organizmów termofilnych, w których rolę stabilizatorów struktury membran pełnią barwniki ksantofilowe, jak na przykład zeaksantyna. W odróżnieniu od cholesterolu, cząsteczki karotenoidów przeszywają całą dwuwarstwę lipidową, zakotwicząc się wiązaniami wodorowymi w przeciwnych rejonach głów polarnych. Ciekaw jestem zdania Doktorantki czy w tym przypadku spodziewać można się funkcjonowania analogicznych mechanizmów reagujących dynamicznie zmianą organizacji molekularnej dwuwarstw lipidowych w powiązaniu ze stopniem ich uwodnienia?

2. Wiele komórek zwierzęcych charakteryzuje się wysoką frakcją obecności cholesterolu w fazie lipidowej, w przedziale od 5 do 40 %mol, wskazując na istotną rolę tych cząsteczek w modulowaniu właściwości strukturalnych oraz dynamicznych membran. Okazuje się, iż szczególnie wysoki poziom cholesterolu sięgający 60 %mol w stosunku do lipidów, notowany jest w membranach soczewki oka ludzkiego. Ciekaw jestem zdania Doktorantki, jak w świetle rezultatów Jej pracy doktorskiej tak wysokie stężenie cholesterolu wiązać się może z funkcjonalnością błon lipidowych specyficzną dla soczewki oka?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr inż. Hanna Orlikowska-Rzeźnik przedstawiła niezwykle wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach oryginalnych prac koncepcyjnych oraz badawczych ogłoszonych w cyklu trzech artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach o międzynarodowej cyrkulacji. Jak wnioskować można na podstawie długiej listy publikacji nie związanych bezpośrednio z projektem doktorskim mgr inż. Hanna Orlikowska-Rzeźnik doskonaliła również swój warsztat naukowy w ramach innych zadań badawczych. W świetle efektów tej aktywności Kandydatka jawi się jako osoba doskonale przygotowana do prowadzenia badań naukowych, zarówno w aspekcie wiedzy jak i umiejętności praktycznych umożliwiających stosowanie licznych, zaawansowanych technik eksperymentalnych oraz formułowania i rozwiązywania ambitnych problemów poznawczych.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr inż. Hannę Orlikowską-Rzeźnik rozprawa doktorska zawiera rozwiązania szczególnie ważnych oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej istotny postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w Ustawie „Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” z dnia 20 lipca 2018 r. W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie pani mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Uwzględniając szeroki zakres przeprowadzonych prac badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego oraz, przede wszystkim, bardzo wysoką rangę uzyskanych wyników naukowych wnoszę również o rozważenie możliwości uznania pracy doktorskiej pani mgr inż. Hanny Orlikowskiej-Rzeźnik jako wyróżniającej.

