

dr hab. Łukasz Ćwiklik
Zakład Chemii Teoretycznej
Instytut Chemii Fizycznej im. J. Heyrovskiego
Czeska Akademia Nauk
Praga, Republika Czeska



Praga, 2 października 2015

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Marceliny Gorczycy

zatytułowanej: „Badanie oddziaływań związków biologicznie aktywnych z modelowymi membranami lipidowymi”

Recenzja przygotowana została na zlecenie Prodziekana Wydziału Chemii UJ, dr hab. Barbary Rys z dnia 1 lipca 2015 r. Opiniowana praca powstała pod opieką naukową prof. dra hab. Jacka Korchowca oraz dr hab. Ewy Luchter-Wasylewskiej.

1. Tematyka, cel i zakres rozprawy.

Praca tematycznie obejmuje fizykochemiczne badania układów modelujących procesy zachodzące w rzeczywistych układach biologicznych. Bardziej szczegółowo, w pracy przeanalizowane zostały oddziaływania oraz wpływ szeregu związków o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym na monowarstwy lipidowe będące uproszczonym modelem membran biologicznych. Jak podaje sama Autorka, celem pracy była charakterystyka oddziaływań potencjalnych środków antybakteryjnych z modelowymi membranami biologicznymi z wykorzystaniem metod badawczych opartych o monowarstwy Langmuira.

Główna motywacja pracy związana jest z pilną potrzebą opracowania nowych, bardziej skutecznych, leków antybiotycznych. Potrzeba ta wynika z rosnącego problemu uodparniania się drobnoustrojów na antybiotyki. W tym świetle sędzę, że dobór tematyki rozprawy i zakres zadań badawczych jest bardzo aktualny i dobrze wpisuje się we współczesny nurt badań fizykochemicznych, biofizycznych i biochemicznych. W tekście rozprawy zabrakło według mnie jasno sformułowanej tezy pracy.

W przedstawionej dysertacji pod uwagę wzięte zostały dwie grupy związków. Pierwsza z nich to pochodne kaliksarenu, w tym przypadku pochodne p-tert-butylokaliks[4]arenu. Wśród pochodnych tych przeanalizowano kaliksareny podstawione cząsteczkami antybiotyków, tutaj β -laktamami, oraz potencjalnie antybiotycznymi grupami guanidynowymi. Kaliksareny są cyklicznymi oligomerami zbudowanymi z jednostek fenolowych. Wykorzystywane są jako nośniki leków. Podstawienie ich grupami o działaniu antibakteryjnym umożliwić może usprawnienie procesu wprowadzania i uwalniania cząsteczek antybiotyków w organizmie. Druga grupa roważonych w pracy związków to bliźniacze amfifilowe pseudopeptydy. Są to surfaktanty dimeryczne zbudowane z dwu cząsteczek aminokwasu, połączonych alkilowym łącznikiem, oraz dwu hydrofilowych łańcuchów. Związki te z uwagi na swój lipofilowy charakter i specyficzną geometrię cząsteczki potencjalnie mogą wykazywać działanie antybiotyczne.

W rozprawie zbadano wpływ rozważanych związków na właściwości szeregu monowarstw lipidowych. Monowarstwy te służyły za model błony komórkowej. W zależności od składu lipidowego, modelować mogą na przykład błonę komórkową bakterii bądź eukariotów. W pracy analizowano przede wszystkim monowarstwy zawierające fosfolipidy z głowami fosfatydlcholinowymi jako modele membran eukariotycznych. Błony komórkowe bakterii rozważano natomiast stosując lipidy z głowami fosfatydlserynowymi i fosfatydylgliceryowymi, a także monowarstwy zawierające kardiolipinę.

W badaniach wykorzystanych zostało aż siedem różnych technik badawczych. Oprócz technik eksperymentalnych (pomiar ciśnienia i potencjału powierzchniowego, mikroskopia pod kątem Brewstera, refleksyjno-absorbcyjna spektroskopia IR z modulacją polaryzacji oraz badania aktywności enzymatycznej), zastosowana też została jedna technika teoretyczna - symulacje dynamiki molekularnej (MD). Połączenie przez Autorkę w ramach jednej pracy eksperymentu i teorii zasługuje moim zdaniem na szczególne uznanie.

2. Omówienie i ocena zawartości rozprawy.

Dysertację otwiera krótki rozdział zawierający zwięzłe lecz kompletne wprowadzenie oraz w sposób poprawny formułujący cele pracy. Jak wspominałem powyżej, warto byłoby umieścić w nim również tezę pracy. Następnie następuje obszerny rozdział z przeglądem obecnego stanu literatury dotyczącej przedmiotu pracy. Autorka rozpoczyna go od omówienia

lipidowych błon biologicznych. Charakteryzuje podstawowe składniki tych błon, przedstawia kluczowe modele używane do ich opisu (model mozaiki i model tratw lipidowych) oraz omawia biologiczne funkcje błon. Wprowadzona zostaje też stosunkowo obszerna informacja o fosfolipazach, a to z powodu wykorzystania fosfolipazy w jednym z wątków badawczych zawartych w pracy. Następnie omówione zostają stosowane w pracy związki antybiotyczne oraz potencjalnie antybiotyczne surfaktanty dimeryczne. W kolejnych rozdziałach następuje opis zastosowanych metod badawczych opartych o monowarstwy Langmuira oraz dynamikę molekularną. Szczególnie cenne są tutaj podrozdziały opisujące poprzednie badania nad lekami antybiotycznymi z wykorzystaniem monowarstw lipidowych oraz dynamiki molekularnej. Część tę zamyka obszerny i szczegółowy opis metodyki badań stosowanej przez Autorkę.

Bardzo wysoko oceniam część literaturową dysertacji. Z uwagi na rozległość rozważanych w pracy zagadnień, dużą liczbę wykorzystanych technik badawczych oraz rozważanych układów, Autorka stanęła przed nie lada wyzwaniem pogodzenia zwięzłości z kompletnością opisu. Z zadania tego wywiązała się według mnie bardzo dobrze. O skali włożonej w tej rozdział pracy świadczyć może chociażby liczba odnośników literaturowych wynosząca aż 267.

Jeśli chodzi o metodykę badań, to była ona, moim zdaniem, dobrana adekwatnie do zakresu i celów pracy. Zarówno cały wykorzystany zakres metod doświadczalnych, jak i towarzyszący im wybrany wariant dynamiki molekularnej, umożliwiły realizację celów pracy w sposób komplementarny i na różnych poziomach opisu.

Kolejna część dysertacji zawiera opis oryginalnych wyników badawczych Doktorantki wraz z ich dyskusją. W przypadku połączeń kaliksarenu z β -laktamami eksperymentalnie wykazano silne zaburzenie przez badane związki monowarstwy modelujących membrany eukariotyczne. Oprócz pomiarów izoterm oraz analizy termodynamicznej, Autorka posłużyła się też pomiarami aktywności katalitycznej lipolizy pokazując, że zostaje ona obniżona w obecności związku antybiotycznego.

Następną grupę badanych związków stanowiły pochodne guanidynowe kaliksarenu. Tutaj badania eksperymentalne zostały uzupełnione o symulacje dynamiki molekularnej. Pozwoliło to na zidentyfikowanie molekularnego mechanizmu wchodzenia cząsteczek antybiotyku do membrany, który przebiega poprzez flip-flop cząsteczek antybiotycznych w membranie.

W przypadku badań związanych z pseudopeptydami bliźniaczymi, gdzie, podobnie jak przedtem, Autorka powiązała techniki eksperymentalne i symulacyjne, wykazano że

długość zastosowanego w pseudopeptydzie alkilowego łącznika determinuje stopień, w jaki peptyd zaburza porządek w membranie. Wykazano, że dłuższe łączniki prowadzą do silniejszego obniżenia porządku cząsteczek lipidów membrany. W części tej szczególnie pozytywnie oceniam pogłębioną analizę wyników symulacji MD. Dzięki niej Autorka potwierdziła bezpośrednio w symulacjach zmiany hydratacji cząsteczek kardiolipiny obserwowane w pomiarach PM-IRRAS oraz nadała im lepszą interpretację na poziomie molekularnym. Podobnie, zastosowana tutaj analiza uporządkowania filmu z wykorzystaniem dwuwymiarowych funkcji rozkładu radialnego pomogła w pełni zinterpretować region współistnienia fazy ciekłej rozprężonej i ciekłej skondensowanej w filmach zawierających kardiolipinę i pseudopeptyd.

Część rozprawy zawierającą wyniki i ich dyskusję oceniam bardzo wysoko. Przede wszystkim, udało się zrealizować cele pracy, czyli w sposób szeroki scharakteryzować oddziaływanie wybranych związków antybakteryjnych z modelami membran biologicznych opartych o lipidowe filmy Langmuira. Wyniki badań zostały zebrane i zaprezentowane w dysertacji w sposób bardzo przejrzysty i logiczny. Dla każdego typu układu Autorka rozpoczyna omawianie wyników od metody koncepcyjnie najprostszej i wspólnej dla wszystkich układów (izotermny), po czym przechodzi do metod bardziej szczegółowych, dobieranych w zależności od potrzeby (mikroskopia BAM, spektroskopia PM-IRRAS, dynamika molekularna etc.).

Rozdziały z wynikami i dyskusją podsumowane zostały w końcowej części rozprawy w postaci kilkunastu punktów opisujących zwięźle najważniejsze wyniki oraz wpływające z nich wnioski. Do najważniejszych wniosków, będących jednocześnie oryginalnym i, moim zdaniem, znaczącym wkładem Doktorantki w swoją dziedzinę badań, należą: wyjaśnienie mechanizmu działania β -laktamowych pochodnych kaliksarenu w membranie; identyfikacja mechanizmu flip-flop dla guanidowej pochodnej kaliksarenu oraz zaproponowanie długich łańcuchów łącznika w amifilowych polipeptydach jako czynnika zwiększającego ich aktywność antybakteryjną. Wyniki opisane w dysertacji zostały opublikowane wcześniej przez Doktorantkę i współautorów w dwóch pracach wydanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej; poza tym jedna praca jest aktualnie w recenzji, a kolejna - w fazie przygotowania. Dodać należy, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mogą bezpośrednio posłużyć jako wskazówka przy projektowaniu nowych związków-kandydatów na leki antybakteryjne.

3. Ocena redakcji pracy.

Poziom edytorski pracy oceniam bardzo wysoko. Dysertacja napisana jest poprawnym językiem, odpowiednim dla prac doktorskich; czyta się ją, przynajmniej subiektywnie dla mnie, przyjemnie. Na marginesie przyznać muszę, że staranność językowa w stosowanej przez Autorkę polskiej terminologii fachowej jest tak wysoka, że stanowiło to kilka razy źródło mojej konsternacji. Układ rozdziałów jest logiczny i przejrzysty. Występują bardzo nieliczne literówki. Poziom graficzny dysertacji jest bez zarzutu – dodałbym może tylko podpisy paneli na wielopanelowych rysunkach aby ułatwić czytelnikowi szybką orientację w prezentowanych tam wynikach. Bibliografia zaprezentowana jest bardzo starannie.

4. Dyskusja usterek rozprawy.

Poniżej podaję listę usterek rozprawy bądź nasuwających się pytań, na które nie znalazłem w pracy odpowiedzi. Chciałbym zaznaczyć, iż wymienione poniżej mankamenty pracy nie obniżają w żadnym sposób mojej pozytywnej całościowej oceny przedstawionej dysertacji. Przy kilku poniższych uwagach (6, 9, 10, 15, 17), prosilibym Doktorantkę o komentarz.

- 1) W rozprawie używany jest termin „modelowa błona biologiczna” na określenie monowarstwy lipidowej. Czy nie byłoby lepiej mówić tu raczej o „modelu błony biologicznej”? Mianem modelowych błon w badaniach *in vitro* określa się raczej dwuwarstwy fosfolipidowe, na przykład w lipozomach czy dwuwarstwach na nośnikach stałych.
- 2) Przy omówieniu tratw lipidowych warto byłoby wspomnieć o powstałych w ciągu ostatnich kilku lat odmiennych hipotezach, modyfikujących pierwotny model tratw i wprowadzających w jego miejsce dynamiczne nanoagregaty lipidowe.
- 3) Na stronach 19-20 znajduje się dość obszerny ogólny opis antybiotyków – moim zdaniem zbędny.
- 4) Na stronie 27 Doktorantka stwierdza, że zerowe ciśnienie laterlane jest charakterystyczne dla nieoddziałujących cząsteczek surfaktantu. Czy tylko? Czy surfaktant tworzący nanoagregaty przy małych stężeniach powierzchniowych nie dałby również zerowego ciśnienia?
- 5) Pisząc o mechanizmie załamania filmu powierzchniowego należałoby zacytować najnowsze prace symulacyjne z grupy Tielemana z Uniwersytetu w Calgary.

- 6) Doktorantka obszernie omawia zalety filmów Langmuira jako modeli błon biologicznych (str. 34). Jakim zdaniem Doktorantki są główne różnice między mono- a dwuwarstwami lipidowymi w kontekście jej badań? W czym upatrywałaby ewentualnych słabych stron zastosowania monowarstw w miejsce dwuwarstw? Przy okazji – lipidowy skład dwuwarstw w badaniach *in vitro* też można precyzyjnie kontrolować, wbrew temu, co wynika ze stwierdzeń na str. 34.
- 7) Czy współczesne pola siłowe można nadal nazwać czysto empirycznymi? Autorka sama podaje, że część parametrów pochodzi z obliczeń kwantowo-chemicznych.
- 8) W opisie metod MD zabrakło wzmianki o zespołach statystycznych ze stałym napięciem powierzchniowym.
- 9) Dlaczego w symulacjach MD monowarstw stosuje się najczęściej trój- zamiast dwuwymiarowych periodyczne warunki brzegowe?
- 10) Jaki wpływ na badane układy miały wprowadzane w niektórych przypadkach jony sodu i wapnia?
- 11) Zabrakło pełnego opisu postępowania przy wyprowadzaniu parametrów dla cząsteczek surfaktantów. Po co optymalizować geometrie? Jak ta geometria przekładała się na parametry w MD? Co z ładunkami na atomach, etc.?
- 12) Przy analizie obrazów BAM w niektórych przypadkach otrzymuje się obrazy jednorodne. Czy znaczy to, że w monowarstwie nie powstają domeny lipidowe?
- 13) Autorka powołuje się na analogie do CX cholesterolu (str. 83). Jak wyglądałoby zachowanie CX w monowarstwach zawierających cholesterol? Czy oczekiwać można na przykład współzawodnictwa między cholesterolem a CX?
- 14) Dlaczego niektóre z dwuwymiarowych funkcji RDF nie są unormowane do jedności?
- 15) W jakiej skali czasowej zachodzi flip-flop CX1? Można się spodziewać, że to proces o stosunkowo wolnej kinetyce. Czy jakąś oznakę tego zjawiska autorka obserwowała w eksperymencie (o ile analizowała zależność ciśnienia powierzchniowego od czasu)?
- 16) Z mojej perspektywy w pracy zabrakło szczegółowego opisu metodologicznego przeprowadzonych symulacji MD. Mam tutaj na myśli na przykład: opis przygotowywania układów, procedury ekwilibracji, kryteriów ekwilibracji, różnic w dynamice poszczególnych układów, czasu obliczeniowego, wydajności. Opis taki, na który zazwyczaj nie mam miejsca w publikacji naukowej, stanowiłby cenną część pracy doktorskiej, użyteczną na przykład dla młodszych studentów.

17) W pracy brak krytycznego odniesienia się do metod i wyników. Czy i ewentualnie jakie słabe strony zastosowanych w pracy metod doświadczalnych i symulacyjnych widzi Doktorantka?

5. Wniosek końcowy.

W mojej opinii, przedstawiona rozprawa doktorska zatytułowana „Badanie oddziaływań związków biologicznie aktywnych z modelowymi membranami lipidowymi” obejmuje oryginalny i wartościowy dorobek naukowy Kandydatki w zakresie chemii. Poziom ocenianej rozprawy odpowiada zarówno ustawowym, jak i zwyczajowym, wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk chemicznych. Rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku. Dlatego też wnioskuję o dopuszczenie pani mgr Marceliny Gorzycy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wyjątkowo wysoki poziom naukowy pracy oraz szeroki zakres przeprowadzonych badań i opanowanych przez Doktorantkę metod badawczych, wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej rozprawy.



dr hab. Łukasz Ćwiklik