



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Wydział Fizyki Technicznej

tel.: 61 6653200, faks: 61 6653201, e-mail: office_dtpf@put.poznan.pl

Katedra Spektroskopii Optycznej

tel.: 61 6653164, faks: 61 6653164, e-mail: office_cos@put.poznan.pl



Dr hab. Tomasz Martyński, prof. nadzw.

e-mail: Tomasz.Martynski@put.poznan.pl

tel.: 61 6653172

Poznań, 31 sierpnia 2015 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr **Marceliny Gorczycy** pod tytułem „Badania oddziaływań związków organicznie aktywnych z modelowymi membranami lipidowymi”, wykonanej pod kierunkiem profesora dr. hab. Jacka Korchowca i promotora pomocniczego dr hab. Ewy Luchter-Wasyłewskiej w Zakładzie Chemii Teoretycznej im. prof. K. Gumińskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Wprowadzanie nowych leków do terapii farmakologicznej to zadanie niezwykle ważne, trudne i czasochłonne. Proces powstawania nowego leku trwa około 20 lat i poprzedzony jest bardzo skrupulatnymi badaniami na wielu poziomach. Jednym z pierwszych etapów jest sprawdzanie na poziomie molekularnym wpływu cząsteczki nowego leku na stan błony lipidowej komórki. To zagadnienie jest opracowywane wieloaspektowo przez liczne i różnorodne grupy badawcze począwszy od badań teoretycznych i symulacji komputerowych po doświadczenia na układach modelowych i natywnych a kończąc na badaniach klinicznych. Zrozumiałe zatem są wysokie nakłady finansowe ponoszone w Unii Europejskiej, USA i wielu innych krajach na badania w tej dziedzinie.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska jest w nurcie zagadnień związanych z projektowaniem i syntezą nowych leków. Dotyczy oddziaływań nowych związków o potencjalnych właściwościach antybakteryjnych z monowarstwami fosfolipidowymi stanowiącymi modele błon komórkowych. Poprzez interdyscyplinarne badania eksperymentalne i teoretyczne uzyskano głęboki wgląd w złożony proces interakcji antybiotyków z fosfolipidami. Praca powstała we współpracy z trzema ośrodkami zagranicznymi głównie ze znanym z długoletniej współpracy laboratorium prof. Ewy

Rogalskiej i prof. Jeana-Bernarda Regnouf de Vainsa (Laboratorium Structure et Reactivite des Systems Moleculaires Complex, CNRS/ Universite de Lorraine) w Nancy, oraz prof. Santiago V. Luisa (Departamento de Quimica Inorganica y Organica, Universitat Jaume I) w Castellon w Hiszpanii.

„ Doktorantka była stypendystką programu Fundacji Rozwoju Systemu Edukacji oraz projektu „Społeczeństwo – Technologie – Środowisko” wspierających jej staże zagraniczne oraz uczestniczyła w pracach w ramach projektu NCN kierowanego przez dr Beatę Korchowiec.

Przedłożona do oceny praca posiada klasyczny układ sześciu rozdziałów: Wprowadzenie i cel pracy, Część literaturowa, Materiały i metody badań, Wyniki badań i ich dyskusja, Wnioski i Bibliografia. Dodatkowo znajduje się zestawienie zastosowanych skrótów a praca kończy się streszczeniem, spisem publikacji i wystąpień konferencyjnych. Całość pracy jest zawarta na 171 numerowanych stronach z dodatkiem stron tytułowych, spisem treści i skrótów, zawiera 82 rysunki, 17 tabel oraz 306 cytowanych pozycji literaturowych. Rozprawa jest skomponowana bardzo poprawnie. Część literaturowa jako teoretyczne wprowadzenie oraz opis dotychczasowego stanu wiedzy stanowi jedną trzecią część pracy. Opisy zastosowanych związków oraz technik pomiarowych zajmują 10% dysertacji. Nieomal połowa objętości pracy to bardzo obszerny materiał eksperymentalny i wnikliwa dyskusja uzyskanych wyników zakończona trzynastoma wypunktowanymi wnioskami i dwustronicowym streszczeniem całej pracy.

Celem przedłożonej mi do recenzji pracy, który postawiła sobie Doktorantka, była charakteryzacja oddziaływań dwóch rodzajów cząsteczek potencjalnych leków z modelowymi błonami biologicznymi w postaci monowarstw fosfolipidowych. Potencjalnymi lekami badanymi w pracy są kaliksareny i dimeryczne surfaktanty. Użyte dwa kaliksareny to związki makrocycliczne pochodne *p-tert*-butylokaliks[4]arenu podstawione cząsteczkami antybiotyku. Dla porównania użyto również monomerkaliksarenu. Kaliksareny syntetyzowano w grupie prof. de Vainsa we Francji. Pięć bliźniaczych pseudopeptydów zawiera dwie cząsteczki aminokwasu, połączone ze sobą alkilowymi łańcuchami o różnej długości oraz dołączone po obu końcach dwa łańcuchy hydrofobowe. Bliźniacze surfaktanty były syntetyzowane w grupie prof. Luisa w Hiszpanii. Cząsteczki były testowane na monowarstwach utworzonych z pięciu fosfolipidów trzech anionowych i dwóch

niejonowych. Fosfolipidy zakupiono w firmach Sigma-Aldrich i Avanti Polar Lipids.

Wybrane przez mgr Gorczycę układy były formowane i charakteryzowane na granicy powietrze–woda z zastosowaniem techniki Langmuira. Poza charakterystykami termodynamicznymi warstw lipidowych, na podstawie izoterm π –A, poddanych działaniu kaliksarenów i bliźniaczych pseudopeptydów wykorzystano zmiany elektrycznego potencjału powierzchniowego podczas sprężania monowarstw (izoterm ΔV –A) oraz rejestrowano tekstury warstw za pomocą mikroskopu Brewstera (BAM). Ważną rolę w interpretacji wyników odgrywają widma podczerwone monowarstw Langmuira rejestrowane trudną i rzadko dostępną techniką PM-IRRAS (polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy). Znaczną i bardzo istotą część rozprawy zajmują obliczenia kwantowo-mechanicznymi (modelowanie molekularne) badanych układów z zastosowaniem odpowiednich funkcjonałów. W pracy wyznaczono unikatowe parametry opisujące kąty odchylenia osi łańcuchów hydrofobowych cząsteczki od normalnej do powierzchni subfazy oraz ich rozkłady radialne.

Zasadniczą część pracy stanowi rozdział zatytułowany „Wyniki badań i ich dyskusja”, które Doktorantka podzieliła na trzy części opisujące oddziaływanie pochodnej kaliks[4]arenu CX, kaliks[4]arenu CX1 i jego monomeru mCX1 oraz bliźniaczych pseudopeptydów na organizację monowarstw lipidowych. Wpływ badanych związków na modelowe błony biologiczne oceniano na podstawie zmian energii swobodnej Gibbsa ΔG^{mix} dwuskładnikowych warstw Langmuira a interpretacja była wspomagana przez analizę zmian potencjału elektrycznego mieszanych monowarstw podczas ich sprężania. Naocznym dowodem na wpływ pseudopeptydów na strukturę monowarstwy lipidowej są zarejestrowane obrazy tekstur za pomocą BAM. Widoczne są stopniowe zmiany przejścia fazowego LE–LC spowodowane kolejnymi surfaktantami bliźniaczymi, które pojawia się dla coraz większych wartości ciśnienia powierzchniowego. Analiza przesunięć pasm drgań symetrycznych i asymetrycznych grup metylenowych w widmach absorpcji w podczerwieni uzyskane za pomocą unikatowego spektrometru PMI firmy KSV (widma PM-IRRAS) pozwoliły Doktorantce określić konformację łańcuchów alkilowych badanych pseudopeptydów w jedno- i dwuskładnikowych monowarstwach.

Wykonane obliczenia kwantowo-mechaniczne silnie wspierają interpretację wyników doświadczalnych i pozwalają dogłębnie zrozumieć mechanizmy molekularne w badanych układach na granicy faz powietrze–woda. Bardzo częstym pytaniem pojawiającym się w

dyskusjach jest jak dalece molekuly w warstwach Langmuira są zanurzone w wodzie. Wyniki przeprowadzonych symulacji komputerowych pokazują rozkłady cząsteczek H₂O wokół fosfolipidów i zmiany powodowane adsorpcją badanych cząsteczek. Przedstawione jest to na obrazach ułożenia cząsteczek fosfolipidów i badanych związków na symulowanej powierzchni wody. Głównymi parametrami jakie analizowano była radialna funkcja rozkładu wybranych atomów (np. fosforu dla fosfolipidów DMPC i DMPS), parametr porządku S_{trans} łańcuchów acylowych fosfolipidów i parametr porządku rotacyjnego G_r , opisujący uporządkowanie obszarów hydrofobowych analizowanych warstw Langmuira.

Badania są bardzo systematycznie przeprowadzone i dobrze udokumentowane doświadczalnie z zastosowaniem komplementarnych metod eksperymentalnych i obliczeń kwantowo-mechanicznych. Materiał badawczy i jego interpretacja nie budzą zastrzeżeń.

W swojej dysertacji Doktorantka wykazała, że:

- dwuskładnikowe monowarstwy Langmuira CX/DLPC mają większe uporządkowanie niż warstwy jednoskładnikowe co można tłumaczyć pojawianiem się wiązań wodorowych; można założyć, że CX będzie miał silne działanie antybakteryjne hamując wpływ enzymów lipolitycznych,
- powstają wiązania wodorowe pomiędzy cząsteczkami guanidynowych pochodnych kaliksarenu CX1 zwiększając hydrofobowość jej korony a przenikanie CX1 do hydrofobowej części błony lipidowej następuje poprzez mechanizm flip-flop, co uzyskała dzięki symulacjom komputerowym MD,
- bliźniacze pseudopeptydy powodują duże zmiany upakowania DMPG i TMCL w monowarstwach mieszanych, zmniejszają uporządkowanie łańcuchów hydrofobowych fosfolipidów co powoduje wzrost penetracji cząsteczek wody aż do części hydrofobowych monowarstw.

Chcę zwrócić uwagę na to, że praca napisana jest bardzo starannie pod względem merytorycznym i edytorskim a poziom dyskusji uzyskanych rezultatów jest wysoki. Wpływ na to ma różnorodność technik charakteryzacji i obszerność materiału doświadczalnego silnie wspartego obliczeniami komputerowymi. Całość dysertacji jest dobrze przemyślana o czym świadczą dwie opublikowane prace w renomowanych czasopismach o dużym współczynniku wpływu (impact factor – IF) oraz dwie następne wysłane do druku.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na nieliczne elementy pracy, które wymagałyby komentarza Doktorantki.

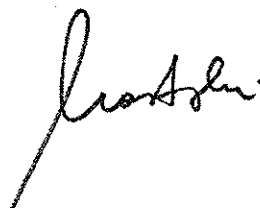
1. Na wykresach powierzchni nadmiarowej oraz nadmiaru energii Gibbsa dla badanych dwuskładnikowych mieszanin nie zamieszczono prostokątów błędów. Doktorantka nie komentuje obliczonych wartości ΔG . Czy $\Delta G^{\text{mix}} \sim 150\text{J/mol}$ to bezwzględnie duża wartość i silna destabilizacja monowarstwy?
2. Wnioski wyciągane z izoterm $\Delta V-A$ są oszczędne a na wielu izotermach można zauważyć znaczne zmiany nachylenia krzywych. W kilku przypadkach rejestracja tych izoterm rozpoczyna się dla zbyt małych wartości średnich powierzchni przypadających na molekułę a przecież potencjał elektryczny ΔV narasta wcześniej niż ciśnienie powierzchniowe π .
3. W rozkładach radialnych funkcji $g^{2D}(r)$ widoczne są oscylacje (np. najwyraźniej widoczne na Rys. 80). Jaka jest interpretacja fizyczna kolejnych ekstremów?
4. Czy poza rozkładami kątowymi ułożenia łańcuchów hydrofobowych wyznaczonych z położenia linii prostej między krańcowymi atomami węgla nie należy analizować odległości między nimi?

W pracy znalazłem nieliczne błędy np. to, że w mikroskopie BAM zastosowany jest zielony laser helowo-neonowy. Na rysunkach przedstawiających wyniki modelowania MD niejasny jest opis osi odciętych „położenie kąta φ w łańcuchu hydrofobowym”. Uważam, że rysunki przedstawiające serie izoterm powinny być większe, by dać czytelnikowi możliwość własnej analizy przebiegu krzywych.

Drobne niedociągnięcia edytorskie nie utrudniają podążanie za argumentacją Autorki ani nie mają wpływu na wartość merytoryczną przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Dużą zaletą pracy jest zastosowanie wielu komplementarnych metod badawczych a zwłaszcza symulacji komputerowych w celu dogłębnego określenia oddziaływań występujących pomiędzy związkami aktywnymi biologicznie a monowarstwą lipidową. Tą część pracy uważam za najbardziej oryginalną i wiele wnoszącą do zrozumienia przedmiotu badań. Mgr Marcelina Gorczyca wykazała, że posiada doświadczenie w pracy badawczej, o czym świadczą wyniki pomiarów prowadzonych w kooperacji z grupami badawczymi z renomowanych ośrodków naukowych w Polsce i Francji. Wyniki prac zostały opublikowane (4 publikacje) w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR) wysokim

parametrze wpływu IF. Były również licznie prezentowane na 7 konferencjach krajowych i zagranicznych w formie plakatowej.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Marceliny Gorczycy stanowi duże osiągnięcie Doktorantki poszerzające wiedzę o oddziaływaniach badanych cząsteczek. Doktorantka udowodniła, że potrafi prowadzić badania naukowe na wysokim poziomie. W moim przekonaniu, przedłożona mi do oceny praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Marceliny Gorczycy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'K. Kozłowski', is centered on the page.