



UNIwersytet
WARSAWski

Wydział Chemii



dr hab. Sławomir Sęk, prof. ucz.
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii,
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel: +48 22 552 6661
e-mail: slasek@chem.uw.edu.pl

Warszawa, 12-12-2019

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marzeny Mach

pt. „Badanie oddziaływań wybranych kationowych pochodnych fosfatydylocholiny z lipidowymi składnikami bakteryjnych i zwierzęcych błon komórkowych”

Praca doktorska mgr Marzeny Mach została zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii w Zespole Fizykochemii Powierzchni pod kierownictwem prof. dr hab. Pawła Wydro, prof. UJ. W swojej pracy Doktorantka postawiła sobie za cel zbadanie oddziaływań wybranych kationowych lipidów, w postaci triestrów diacylo-fosfatydylocholiny, z lipidami występującymi w błonach biologicznych komórek bakteryjnych oraz zwierzęcych. Motywacją dla podjęcia tego typu badań jest zwiększenie potencjału aplikacyjnego lipidów w obszarach biomedycznych, co wynika z ich unikalnych właściwości. W tym kontekście, zgłębienie charakteru oddziaływań lipidów z modelowymi filmami lipidowymi może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów dostarczania leków, lipofekcji oraz aktywności przeciwbakteryjnej tego typu związków. Zatem podjęta w pracy tematyka jest bez wątpienia atrakcyjna i bardzo aktualna, przy czym znaczenie uzyskanych wyników może zdecydowanie wykraczać poza obszar chemii.

Rozprawa doktorska obejmuje łącznie 204 strony, przy czym została podzielona na część literaturową oraz eksperymentalną. Język rozprawy zarówno pod względem merytorycznym, jak i stylistycznym jest poprawny, a literatura została dobrana prawidłowo i uwzględnia najważniejsze publikacje w omawianej tematyce. Praca została starannie przygotowana również od strony edytorskiej. Na początku rozprawy zamieszczono wprowadzenie, gdzie jednocześnie zdefiniowano również cel pracy oraz pokrótce

przedstawiono motywację dla podjęcia opisanych w rozprawie badań. W kolejnych rozdziałach składających się na część literaturową, autorka przedstawiła strukturę i właściwości lipidów kationowych oraz ich aktualne, jak i potencjalne zastosowania. Szczególną uwagę poświęcono triestrom diacylo-fosfatydylocholin, które stanowiły główny obiekt badań w niniejszej pracy. Opisano również zastosowanie lipidów kationowych jako nośników materiału genetycznego w terapii genowej oraz możliwy mechanizm lipofekcji. Dalsze rozdziały obejmują omówienie struktury i właściwości membran biologicznych oraz ich biomimetycznych modeli opartych na filmach lipidowych. Zwieńczeniem części literaturowej jest opis metod instrumentalnych wykorzystywanych w badaniach modelowych warstw lipidowych. Należy wyraźnie zaznaczyć, że wspomniana część literaturowa została przedstawiona w bardzo uporządkowany sposób, przy czym treść jest umiejętnie dobrana i bezpośrednio odnosi się do części eksperymentalnej pracy. Świadczy to o zgłębieniu przez Autorkę tematyki rozprawy doktorskiej. Niemniej jednak, w niektórych miejscach czytelnik może natknąć się na drobne nieścisłości, które warto byłoby sprostować. Szczegółowe uwagi są następujące:

- Na stronie 13 pojawia się stwierdzenie, że związek przeciwbakteryjny o oznaczeniu CSA-13 jest przykładem carageninu. Prawidłowe określenie to ceragenina.
- Na stronie 14 znajdujemy informację, iż etylofosfatydylocholin, z nasyconymi łańcuchami acylowymi zorganizowane w dwuwarstwy wykazują podobną do niepodstawionych odpowiedników temperaturę przemiany fazowej żel – ciecz krystaliczna, ale w fazie ciekłokrystalicznej ilość cząsteczek wody pomiędzy dwuwarstwami jest mniejsza w stosunku do natywnych fosfatydylocholin. Czy efekt ten jest związany bezpośrednio z obecnością dodatkowego podstawnika przy grupie fosforanowej, który ewentualnie może wpływać na hydratację głów polarnych? Szersze omówienie tego zagadnienia wydaje się o tyle istotne, że w części eksperymentalnej zmniejszenie średnicy hydrodynamicznej liposomów w obecności kationowych lipidów przypisywane jest zmianie grubości warstwy hydratacyjnej. Zatem efekty te wydają się być powiązane.
- W rozdziale I.2 dotyczącym mechanizmów działania amfifilowych środków przeciwbakteryjnych na membrany lipidowe, warto byłoby pokusić się o krótkie omówienie dwóch dość istotnych mechanizmów opartych na formowaniu kanałów lub porów w membranie. Konkretnie chodzi o model klepek beczki oraz model toroidalny, które są dość charakterystyczne np. dla amfifilowych peptydów. O ile ten pierwszy

model jest dość trudny do wyobrażenia w przypadku kationowych lipidów, o tyle ten drugi wydaje się prawdopodobny.

- Na stronie 29, zamieszczone dwukrotnie odwołania do Rysunku 9 prawdopodobnie powinny odnosić się do Rysunków 13 oraz 14, które ilustrują odpowiednio omawiane w tekście sfingolipidy oraz sterole.
- Z kolei na stronie 32 znajdujemy opis porządkującego oraz kondensującego efektu cholesterolu na membrany lipidowe. W rzeczywistości efekt cholesterolu jest nieco bardziej złożony i pełni on rolę swoistego „buforu płynności” membrany. Innymi słowy, poniżej temperatury przejścia fazowego zaburza uporządkowanie lipidów zwiększając płynność membrany (w porównaniu do układu bez cholesterolu), podczas gdy powyżej temperatury przejścia fazowego ogranicza ruchliwość łańcuchów acylowych zmniejszając tym samym płynność membrany (ponownie w porównaniu do układu bez cholesterolu).
- Na stronie 36, Autorka stwierdza, że odmienny od pozostałych lipidów kształt kardiolipin sprawia, że szczególnie wpływają one na napięcie oraz krzywiznę błony. Warto byłoby doprecyzować o jakie napięcie chodzi oraz jaki jest ewentualnie wspomniany wpływ.

Część eksperymentalną otwiera opis wykorzystywanych związków chemicznych oraz procedur pomiarowych, po którym przedstawiono skład lipidowy modelowych filmów. W tym miejscu należy zaznaczyć, iż dobór składników lipidowych został starannie przemyślany tak, aby odzwierciedlał skład membran odpowiednich błon komórek bakteryjnych oraz eukariotycznych. Następnie systematycznie opisano wyniki eksperymentów przeprowadzonych dla monowarstw Langmuira oraz dwuwarstw w postaci pęcherzyków lipidowych, odpowiednio w nieobecności oraz po wprowadzeniu do nich badanych kationowych lipidów. W tym celu wykorzystano liczne metody instrumentalne obejmujące technikę Langmuira, mikroskopię kata Brewstera, metodę dynamicznego rozpraszania światła (DLS), pomiar potencjału dzeta oraz metody fluorescencyjne. Kolejne rozdziały obejmują interpretację uzyskanych rezultatów, gdzie porównano między innymi powinowactwo kationowych lipidów do poszczególnych modelowych membran lipidowych oraz przedyskutowano ich wpływ na właściwości i organizację wspomnianych membran. W ostatniej części pracy zestawiono najważniejsze wnioski. Tutaj należy zwrócić uwagę na kilka elementów, które stanowią o wysokiej wartości poznawczej przedstawionej do oceny rozprawy. Autorka wykazała że obecność lipidów w filmach POPC/cholesterol, sfingomielina/cholesterol oraz POPC/sfingomielina/cholesterol, które imitują membrany

komórek eukariotycznych, osłabia korzystne oddziaływania pomiędzy lipidami i tym samym zmniejsza uporządkowanie łańcuchów acylowych w warstwie powodując zwiększenie jej płynności. Jednocześnie wpływa również na ładunek powierzchniowy membrany i zwiększa jej przepuszczalność dla wody oraz jonów. Efekt ten wynika ze zwiększonego rozmiaru głów polarnych lipidów oraz obecności zlokalizowanego na nich ładunku dodatniego. Ten ostatni odpowiada za zwiększone oddziaływania odpychające w warstwie, w szczególności przy wzroście stężenia lipidów. Co więcej, upłynnienie warstw bardziej uwydatnia się w przypadku kationowych lipidów posiadających nienasycone wiązania, wskazując na synergiczny charakter oddziaływań. Wyniki te niewątpliwie mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów działania kationowych lipidów w procesach lipofekcji oraz kontrolowanego dostarczania leków. Kolejnym istotnym rezultatem pracy jest wykazanie korzystnych termodynamicznie oddziaływań lipidów ze składnikami lipidowymi charakterystycznymi dla błon komórek bakteryjnych. Doktorantka dowiodła, że istotne znaczenie mają tutaj oddziaływania elektrostatyczne kationowych lipidów z ujemnie naładowanymi fosfatydyloglicerolem oraz kardiolipiną. W tym przypadku, wbudowanie się lipidów w filmy lipidowe skutkuje zarówno zaburzeniem organizacji molekularnej membrany, jak również zmianą jej ładunku powierzchniowego i przepuszczalności. Wynik ten z pewnością można uznać za istotny z punktu widzenia potencjalnego wykorzystania tego typu związków, przykładowo w leczeniu infekcji bakteryjnych. Pomimo stwierdzenia, iż aktywność przeciwbakteryjna jednego z lipidów (EPOPC) jest na umiarkowanym poziomie, to nadal mogą one być rozważane jako elementy składowe nośników liposomalnych ułatwiających inkorporację właściwego związku do wnętrza komórki bakteryjnej. O dużym znaczeniu przytoczonych powyżej wyników badań, świadczy fakt opublikowania ich w cenionych periodykach naukowych z dziedziny fizykochemii powierzchni oraz biomembran. Niemniej jednak, po lekturze części eksperymentalnej rozprawy nasuwają się pewne pytania i drobne wątpliwości, do których warto byłoby się ustosunkować. Szczegółowe uwagi są następujące:

- Suchy film lipidowy do formowania liposomów z uwięzioną w nich sondą fluorescencyjną był hydratowany z wykorzystaniem wodnego roztworu kalceiny w 1 M PBS. Zatem takiego składu roztworu należy oczekiwać wewnątrz liposomu. Następnie do celów miareczkowania posłużono się roztworem Triton X-100. Czy w związku z tym nie istnieje zagrożenie, że liposomy będą uwalniać barwnik nie tylko z powodu obecności surfaktantu, ale również w wyniku pęknięcia pod wpływem znacznej różnicy stężeń jonów

wewnątrz i na zewnątrz liposomu? Powstawanie defektów, jak również liza pęcherzyków lipidowych pod wpływem ciśnienia osmotycznego była przedmiotem licznych prac (np. Hallett et al. Mechanical Properties of Vesicles. II. A Model for Osmotic Swelling and Lysis. *Biophys. J.* 1993, 64, 435.; Hantz et al. The Osmotic Response of Large Unilamellar Vesicles Studied By Quasi-Elastic Light-Scattering. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 862, 379; Mui et al. Osmotic Properties of Large Unilamellar Vesicles Prepared by Extrusion. *Biophys. J.* 1993, 64, 443). Dodatkowo, nasuwa się również pytanie, czy przy takim podejściu eksperymentalnym możemy odróżnić zmiany przepuszczalności od solubilizacji membrany.

- W nawiązaniu do eksperymentów opisujących zmiany przepuszczalności dwuwarstw lipidowych pojawia się informacja, iż układy zawierające kationowe lipoidy w wyższych stężeniach nie wykazują zdolności formowania liposomów z uwięzionym barwnikiem. Można przyjąć, że nie jest to związane z geometrią cząsteczek lipoidów, a w konsekwencji z ich parametrem upakowania, ponieważ możliwe było otrzymanie liposomów bez barwnika nawet w obecności stosunkowo wysokich stężeń lipoidów. Pojawia się zatem pytanie, jaka jest przyczyna wspomnianych ograniczeń?
- Zmiany intensywności fluorescencji dla układu POPE/POPG z dodatkiem lipoidów wskazują na wzrost przepuszczalności dwuwarstwy, podczas gdy analogiczny eksperyment wykonany dla POPE/POPG/TOCL z dodatkiem lipoidów wskazuje, że mamy do czynienia z odwrotnym efektem. Można zatem przypuszczać, że istotną rolę odgrywa tutaj obecność kardiolipiny. Być może oprócz efektów elektrostatycznych warto tutaj rozważyć geometrię cząsteczek. Kardiolipina charakteryzuje się wartością parametru upakowania $CPP > 1$, natomiast dla lipoidów stosowanych w pracy można oczekiwać wartości $CPP < 1$. Wówczas cząsteczki te wykazywałyby odwrotną tendencję do formowania krzywizny w dwuwarstwie. W związku z tym, kardiolipina mogłaby potencjalnie kompensować naprężenia dwuwarstwy generowane przez lipoidy i tym samym utrudniać permeabilizację membrany. Czy tego typu scenariusz może być brany pod uwagę przy interpretacji uzyskanych w pracy wyników?
- Pomimo, że terminy opisujące kształt domen lipidowych na zdjęciach BAM są dość obrazowe i sugestywne („domeny przypominające kwiaty” lub „domeny przypominające

płatki śniegu”), bardziej właściwe w tekście naukowym wydaje się zastąpienie ich określeniem „dendrytyczne”, którym zwykle opisuje się krystality o strukturze fraktalnej.

W tym miejscu trzeba podkreślić, że przedstawione powyżej uwagi krytyczne i komentarze absolutnie nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę przedłożonej rozprawy doktorskiej, przy czym mają one raczej charakter polemiczny, bądź zachęcają Autorkę pracy do uściślenia pewnych zagadnień.

Z pewnością należy również docenić dotychczasowe osiągnięcia naukowe mgr Marzeny Mach. Na jej dorobek publikacyjny składa się 7 prac w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej. Przy czym są to pozycje obejmujące cenione tytuły takie, jak *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* oraz *Langmuir*, które aktualnie stanowią bodajże najszerokie forum wymiany myśli naukowej w szeroko pojętej tematyce biomimetycznych warstw lipidowych oraz ich oddziaływań z biomolekułami. Równie duże wrażenie robi dorobek konferencyjny obejmujący 17 konferencji międzynarodowych oraz 9 krajowych. Dowodzi to bardzo dużej aktywności doktorantki w zakresie upowszechniania wyników swoich badań.

Podsumowując, w mojej opinii przedłożona do recenzji praca doktorska zawiera bardzo interesujące oraz wartościowe wyniki badań. Co istotne, zostały one przedstawione w przejrzysty sposób, a ich interpretacja oraz wyciągnięte na ich podstawie wnioski są logiczne i w pełni uzasadnione. Pracę oceniam zdecydowanie pozytywnie i stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marzeny Mach do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę znaczenie i jakość badań zaprezentowanych w rozprawie oraz dorobek Doktorantki, do niniejszej recenzji załączam wniosek o wyróżnienie pracy Pani mgr Marzeny Mach.

