



emeryt. prof. dr hab. Kazimierz Małysa

Kraków, 26, 07, 2017 r.

### Recenzja pracy doktorskiej

p. mgr Justyny Mildner

**pt. *"Badanie wpływu wybranych leków znieczulających miejscowo na monowarstwy lipidowe modelujące błony komórek nerwowych, mitochondriów i erytrocytów"***

Pani mgr Justyna Mildner wykonała swoją pracę doktorską w Zakładzie Chemii Ogólnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem p. prof. dr hab. Patrycji Dynarowicz-Łątka. Celem badań wykonanych w recenzowanej pracy doktorskiej było określenie wpływu wybranych 4-ech leków (lidokaina - LiC, mepiwakaina - MC, prylokaina - PriC, ropiwakaina - RC) znieczulających miejscowo (LZM) na właściwości jedno-, dwu- i trój-składnikowych monowarstw formowanych z 7 lipidów błonowych, różniących się między sobą budową zarówno części apolarnej jak i polarnej cząsteczki. Monowarstwy o zmienianym składzie były formowane i badane w ściśle kontrolowanych warunkach na skomputeryzowanej wadze Langmuira.

Monowarstwy lipidowe są układem modelowym bardzo szeroko stosowanym w literaturze światowej w badaniach właściwości membran biologicznych. Związane jest to z powszechnie przyjętym podejściem, że efektywność działania większości biologicznie czynnych substancji i leków zależy od aktywności (oddziaływań) molekuł tych związków chemicznych na powierzchniach międzyfazowych komórek i/lub ich penetracją poprzez błony komórkowe. Z tych względów waga Langmuira jest tak powszechnie stosowaną techniką w badaniach wpływu składu monowarstw lipidowych na oddziaływania i penetrację przez molekuly substancji rozpuszczonych w sub-fazie ciekłej pod monowarstwami. Atrakcyjność techniki Langmuira związana jest także ze stosunkową łatwością wytwarzania i dużymi możliwościami precyzyjnego zmieniania składu formowanych monowarstw i kontrolowania na skomputeryzowanych wagach Langmuira wpływu tych zmian oraz stopnia upakowania monowarstw na wielkości kolektywnych

oddziaływań występujących w tych samoorganizujących się układach molekularnych i zmiany tych oddziaływań wskutek obecności i/lub penetracji molekuł rozpuszczonych w sub-fazie ciekłej pod monowarstwą. Ponadto rozwój komplementarnych technik (BAM, spektroskopie IR, UV-Vis, X-ray diffraction) umożliwiających wizualizację i głębsze poznanie struktury i właściwości wytworzonych monowarstw Langmuira powoduje, że technika ta jest bardzo powszechnie stosowana w badaniach prowadzonych w całym świecie, czego dobrą ilustracją jest liczba ponad 17 000 odnośników literaturowych pokazywanych przez ISI Web of Science po wpisaniu hasła „Langmuir monolayer” oraz prawie 11 000 po wpisaniu hasła „lipid monolayer” (w tym ponad 2 500 w ostatnich 5 latach). Liczby te ilustrują jak aktualna i ciesząca się szerokim zainteresowaniem jest tematyka i metodyka badań przedstawione w pracy doktorskiej p. mgr Justyny Mildner.

Rozprawa doktorska p. mgr Justyny Mildner liczy 167 stron i zawiera 143 wykresy i rysunki. Układ pracy jest klasyczny, tzn. jest podzielona jest na 2 podstawowe części: teoretyczną i doświadczalną, uzupełnione o jasno i zwięźle przedstawiony cel pracy oraz streszczenia w j. polskim i angielskim. Bibliografia jest obszerna i obejmuje 287 pozycji światowej literatury, w prawie 100% anglojęzycznej. Bardzo użyteczny jest dodany na początku pracy spis skrótów używanych powszechnie w tekście. Tekst pracy jest napisany poprawnym językiem, a zagadnienia w niej omawiane są przedstawione w sposób przejrzysty, co pokazuje, że Doktorantka rozumie zagadnienia, o których pisze i potrafi je poprawnie przedstawić.

Część literaturowa to 3 rozdziały, w których na 42 stronach p. mgr Justyna Mildner kolejno przedstawia i analizuje literaturowe dane dotyczące: i) leków znieczulających miejscowo (LZM), ii) monowarstw Langmuira, oraz iii) najważniejsze metody stosowane w badaniach właściwości monowarstw otrzymany na wagach Langmuira. W pierwszym rozdziale Doktorantka przedstawia ogólną charakterystykę leków znieczulających miejscowo (LZM), ich zastosowania i mechanizmy działania. Podkreśla tutaj, że mechanizm działania LZM nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśniony, ale wiadomym jest, że zniesienie odczuwania bólu następuje wskutek blokowania przewodzenia impulsów elektrycznych przez błonę komórkową poprzez blokowania przepuszczalności jonów sodu. Doktorantka jasno przedstawia hipotezy zgodnie, z którymi zablokowanie kanałów jonowych może następować wskutek: i) bezpośredniego łączenia się cząsteczek leków z

kanalami, lub ii) poprzez interakcję cząsteczek leków z dwuwarstwą lipidową błony komórkowej, co powoduje modyfikację jej właściwości fizykochemicznych i także zapobiega otwieraniu kanałów jonowych. Słusznie podkreśla, że są to nawzajem uzupełniające się mechanizmy i przekonywująco argumentuje także tutaj, że badania na wagach Langmuira dostarczają istotnych informacji na temat wpływu cząsteczek LZM na właściwości fizykochemiczne monowarstw lipidowych i są b. pomocne dla określenia mechanizmu działania różnych anestetyków. W następnym rozdziale omówione są właściwości i metodyki otrzymywania monowarstw Langmuira, ze szczegółowym omówieniem i uzasadnieniem możliwości poznawczych wynikających z zastosowań techniki monowarstw Langmuira do modelowania błon komórkowych oraz do badania ich oddziaływań z cząsteczkami bioaktywnymi. Wartym odnotowania z uznaniem jest fakt, że Doktorantka podkreśla tutaj mocno jak istotna jest powtarzalność w wyznaczaniu izoterm  $\pi - A$ , czyli zmian ciśnienia powierzchniowego z powierzchnią przypadająca na cząsteczkę w monowarstwie Langmuira, i omawia dokładnie najistotniejsze - 10 najczęściej popełnianych błędów w procedurach formowania monowarstw i wyznaczania izoterm  $\pi - A$ . W ostatnim rozdziale części literaturowej omówione są najważniejsze metody stosowane w badaniach właściwości monowarstw Langmuira, tj. pomiar ciśnienia powierzchniowego oraz rozwinięte w ostatnich latach metody mikroskopowe (BAM – *Brewster Angle Microscopy*) i spektroskopowe (PM-IRRAS – *Polarization Modulation Infrared Reflection-Adsorption Spectroscopy*, SERS – *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*).

Część literaturowa rozprawy, która jest przejrzysta i zawiera najistotniejsze informacje związane z tematyką i badaniami wykonanymi w pracy, pokazuje, że Doktorantka potrafi krytycznie analizować literaturę przedmiotu i wykorzystać dostępne dane literaturowe do zaplanowania własnych badań i analizy otrzymanych wyników.

W I-szym rozdziale części eksperymentalnej mgr Justyna Mildner przedstawia rozpuszczalniki i odczynniki używane w badaniach, ich pochodzenie i stopień czystości oraz struktury cząsteczkowe 7 lipidów używanych do formowania monowarstw Langmuira, a mianowicie; i) syntetyczna 1,2-dipalmitylo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC), ii) syntetyczna 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC), iii) syntetyczny cholesterol (Chol), iv) syntetyczna 1-palmitylo-2-oleilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (POPC), v) syntetyczna 1,2-palmitylo-2oleilo-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), vi) sfingomielina z żółtka jaja kurzego (SM) i vii) kardiolipina z serca wołowego (CL).

Omawia dokładnie metodyki przygotowywania roztworów leków, lipidów, mieszanin lipidów i ich jedno- dwu- i trój-składnikowych monowarstw, a także pomiarów ciśnienia powierzchniowego i rejestracji obrazów monowarstw metodą BAM oraz widm odbiciowo-absorpcyjnych z modulacją polaryzacji (metoda PM-IRRAS). W II-gim, najobszerniejszym (60 stron tekstu) rozdziale, Doktorantka przedstawia kolejno wyniki badań nad oddziaływaniami amidowych LZM (lidokaina - LiC, mepiwakaina - MC, prylokaina - PriC, ropiwakaina - RC) z kolejno: i) jednoskładnikowymi monowarstwami wszystkich badanych lipidów, ii) dwuskładnikowymi monowarstwami wytworzonymi z mieszanin cholesterolu z DPPC, POPC, DOPC, POPE i SM, oraz iii) monowarstwami trójskładnikowych zbudowanymi z Chol-POPC-SM oraz Chol-POPC-PL. W badanych dwuskładnikowych monowarstwach Chol-DPPC, Chol-POPC, Chol-DOPC, Chol-POPE ułamek molowy cholesterolu wynosił 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8, natomiast w przypadku mieszanej monowarstw Chol-SM ułamek molowy sfingomieliny wynosił 0,25 oraz 0,5, co – jak pisze Doktorantka - odpowiada proporcjom tych lipidów w błonach komórek nerwowych oraz erytrocytów i mitochondriów. W układach trójskładnikowych stosunek molowy POPC:SM i POPC:Cl był stały (1:0,9 i 1:0,35) natomiast ułamek molowy cholesterolu zmieniano podobnie jak w układach dwuskładnikowych, od 0,2 do 0,8. Izotermy  $\pi$ -A dla wszystkich monowarstw, oraz obliczane na ich podstawie wartości modułów ściśliwości ( $C^{-1} = -A(d\pi/dA)_T$ ), wyznaczano zawsze na subfazach czystej wody oraz roztworach badanych leków o stężeniu  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ . W analogiczny sposób rejestrowano i porównywano zdjęcia BAM otrzymywane przy różnych ciśnieniach powierzchniowych monowarstw oraz dla wybranych układów widma PM-IRRAS. W przypadku monowarstw dwu- i trój-składnikowych wyznaczane były także zależności średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w zależności od składu mieszanej monowarstwy i przy różnych ciśnieniach powierzchniowych. Odstępstwa od idealnego mieszania - kiedy średnia powierzchnia jest sumą iloczynów zawartości składników w mieszaninie i ich średnich powierzchni cząsteczkowych w monowarstwach jednoskładnikowych - świadczą o występowaniu oddziaływań pomiędzy różnymi cząsteczkami monowarstwy. W oparciu o wyznaczone nadmiarowe (niedmiarowe) średnie powierzchnie cząsteczkowe zostały także obliczone i przedstawione na wykresach wartości nadmiarowych entalpii swobodnych mieszanin w funkcji ich składu i ciśnienia powierzchniowego (dodatnie wartości tej entalpii pokazują, że oddziaływania są mniej przyciągające i dlatego mieszana monowarstwa jest mniej stabilna). Ta imponująca ilość wyników uzyskanych przez Doktorantkę jest zwięźle omówiona i

przedstawiona w rozdz. 2 na 100 wykresach. W ostatnim rozdziale przedstawiona jest dyskusja i całościowa analiza porównawcza wpływu badanych leków na właściwości fizykochemiczne monowarstw jedno-składnikowych zbudowanych z lipidów o różnej budowie łańcuchów węglowodorowych (nasycone, nienasycone) i grup hydrofilowych oraz wpływu składu lipidowego dwu- i trój-składnikowych monowarstw na podatność tych monowarstw na działanie leków. Analiza wpływu badanych LZM na zmiany właściwości fizykochemicznych monowarstw lipidowych oraz wielkości ich oddziaływań z lipidami wykonana została w oparciu o wyznaczone różnice w wartościach: i) powierzchni minimalnych przypadających na cząsteczkę, ii) modułów ściśliwości, oraz iii) nadmiarowej entalpii swobodnej pomiędzy monowarstwami na subfazach czystej wody i roztworów lekarstw.

Rozprawa doktorska p. Justyny Mildner to solidna praca naukowa, w której dzięki logicznie zaplanowanym i starannie wykonanym badaniom, na dobrze zdefiniowanych i precyzyjnie przygotowywanych jedno- i wieloskładnikowych monowarstwach lipidów, modelujących błony komórkowe, uzyskano szereg nowych i ciekawych danych dotyczących oddziaływań i penetracji 4 badanych leków (LZM) do monowarstw lipidowych o różnorodnym składzie. Za najciekawsze z wyników przedstawionych w pracy doktorskiej uważam:

- wykazanie, że badane leki powodują zmniejszenie kondensacji monowarstw, co wskazuje na słuszność hipotezy, że interakcje cząsteczek leków z lipidami błony komórkowej powodują modyfikacje właściwości fizykochemicznych błony, które mogą zapobiegać otwieraniu kanałów jonowych. oraz

- wykazanie, że różnice w budowie łańcuchów węglowodorowych lipidów - obecność w łańcuchach nienasyconych wiązań (DPPC - 0, POPC - 1, DOPC - 2) - powodują, że zmiany stopnia upłynnienia monowarstw lipidowych są b. różne – największe w przypadku DPPC, najmniejsze przy DOPC.

W rozprawie doktorskiej p. mgr Justyny Mildner są jednak także pewne nieścisłości i błędy, z których najistotniejsze chciałbym tutaj wymienić:

- na str. 32 napisano: "... ciśnienie powierzchniowe jest wówczas bliskie zeru ( $\leq 0$  mN/m) ..... " .... intryguje mnie czy w przypadku nierozpuszczalnych monowarstw ciśnienie powierzchniowe rzeczywiście może być mniejsze od zera???!!!

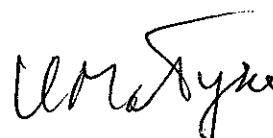
- na str. 119 Doktorantka omawiając wykresy 111-114 napisała: "... stwierdza się, że dla MC (w zakresie ułamków molowych cholesterolu 0,2-08) oraz dla LiC i PriC .....  $\Delta G^{exc}$  przyjmuje niższe wartości niż na subfazie wodnej ....." – natomiast powinno być napisane: **niższe wartości bezwzględne ....**", bo przecież ok. -1200 kJ/mol, która mamy na wykresie 114 dla mepiwakaliny, to jest wartość wyższa niż ok. -1900 kJ/mol, którą mamy na wykresie 111 dla subfazy wodnej,

- w wykazie skrótów mamy napisane: "..... RC – ropiwakaina, chlorowoderek mepiwakainy ", a powinno być: **chlorowoderek ropiwakainy**,

- podpisy pod rys. 88 i 89 są pomieszczone.

Te krytyczne uwagi w niczym nie wpływają na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej wykonanych badań i otrzymanych wyników. Badania przedstawione w tej pracy doktorskiej były b. dobrze zaplanowane i starannie wykonane, a analiza i opis otrzymanych wyników pokazuje, że Doktorantka dobrze orientuje się w literaturze przedmiotu i potrafi poprawnie analizować otrzymane wyniki.

Podsumowując stwierdzam, że poza wiedzą z zakresu tematyki rozprawy i znajomością różnych technik badawczych, Doktorantka wykazała się umiejętnością logicznego zaplanowania badań, pracowitością i umiejętnością wykonywania precyzyjnych pomiarów oraz poprawnej analizy otrzymanych wyników, co pokazuje, że jest zdolna do samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Praca doktorska p. mgr Justyny Mildner zawiera wiele cennych wyników i uważam, że spełnia wszelkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym - wraz z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami. W związku z tym wnioskuję o jej przyjęcie i dopuszczenie p. mgr Justyny Mildner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Kazimierz Małysa

Kraków, dnia 26.07.2017