



Kraków 7.10.2013

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR MONIKI ORLOF
„Fizykochemiczne badania pochodnych kaliksarenów do zastosowań
biomedycznych”

Lipidowe monowarstwy Langmuira na granicy faz powietrze-subfaza wodna stanowią podstawowy układ modelowy dla błon biologicznych. Wprawdzie jest to model bardzo uproszczony gdyż może odzwierciedlać właściwości tylko połowy membrany ale umożliwia zastosowania szeregu metod badawczych, takich jak na przykład: pomiary zależności ciśnienia i potencjału powierzchniowego od powierzchni przypadającej na cząsteczkę, właściwości wiskoelastycznych, wyznaczenia stopnia uporządkowania składników warstwy, czy identyfikację grup chemicznych i ich orientacji względem subfazy wodnej. Metody te mogą dostarczyć pośredniej informacji dotyczącej oddziaływań składników błon biologicznych n.p., fosfolipidów czy steroli z substancjami czynnymi rozpuszczonymi w subfazie wodnej. Badania monowarstw Langmuira są dużo prostsze niż realniejszych układów na przykład liposomów utworzonych z fosfolipidów, które realistyczniej odtwarzają właściwości membran biologicznych.

Praca doktorska Pani mgr Moniki Orlof wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Pałuch jako promotora oraz dr Beaty Korchowicz jako promotora pomocniczego dotyczy właściwości powierzchniowych modyfikowanych kaliksarenów oraz ich oddziaływań z monowarstwami Langmuira zbudowanymi z fosfolipidów będących podstawowymi elementami budulcowymi błon biologicznych. Kaliksareny to nowe związki makrocykliczne cieszące się w ostatnich latach, dużym zainteresowaniem. Ze względu na budowę kielichową, bezpośrednio lub po ich stosownej modyfikacji, mogą koordynować jony lub cząsteczki o określonej wielkości odpowiadającej rozmiarom kielicha. Dzięki temu oraz ze względu na nieskomplikowaną syntezę stanowią obiecujące obiekty jako sensory w chemii supramolekularnej, związki kompleksujące dla jonów, białek czy nukleotydów a także jako wehikuly do transportu leków. Z tych względów przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Orlof było po pierwsze: określenie właściwości filmów powierzchniowych utworzonych z naliksydowych pochodnych kaliksarenów jak i ich kompleksów z kationami metali oraz ich

oddziaływań z cholesterolem. Kwas naliksydowy jest antybiotykiem o aktywności względem niektórych bakterii Gram-ujemnych o ograniczonej penetrowalności do tkanek. Drugim celem było określenie oddziaływań i stopnia penetracji kaliksarenu modyfikowanego grupami guanidynowymi oraz jego monomerycznego odpowiednika do fosfolipidowych monowarstw Langmuira. Warto podkreślić, że praca doktorska powstała w wyniku współpracy z prof. Ewą Rogalską z laboratorium „Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes” UMR CNRS 7565, Université de Lorraine, Nancy a wszystkie kaliksareny użyte do badań miały charakter unikatowy, były zsyntezowane przez prof. Jean-Bernard Regnof de Vains. Laboratorium w Nancy jest bez wątpienia jednym z wiodących ośrodków prowadzących badania właściwości związków makrocyclicznych w tym kalisarenów.

Praca doktorska Pani mgr Moniki Orlof ma układ klasyczny. Liczy 190 stron i składa się z pięciu rozdziałów do których dołączone jest streszczenie i bibliografia licząca 331 pozycji. Autorka dodała również zestawienie swojego dorobku naukowego, na który składają się cztery publikacje w czasopismach z „listy filadelfijskiej”, jedna publikacja przesłana do druku oraz 10 wystąpień konferencyjnych w postaci plakatów. Według bazy Web of Knowledge opublikowane prace były cytowane do tej pory 11 razy (bez autocytowań).

Pierwszy rozdział pracy to „Wprowadzenie i cel pracy”. Rozdział ten mógłby zostać znacznie skrócony ponieważ autorka zupełnie niepotrzebnie ubiega przyszłość (jeżeli chodzi o czytającego) i zawiera w nim zapowiedź otrzymanych wyników i elementy podsumowania. Osobistą preferencją recenzenta jest sformułowanie celu pracy nie na jej wstępie jak to zrobiła doktorantka, a po przeglądzie literaturowym. Taki układ pracy pozwala na lepsze umiejscowienie zamierzeń autorki/autora w obrębie tematyki badawczej i lepsze uzasadnienie aktualności podjętego zagadnienia. Rozdział II stanowi część literaturową w której doktorantka omawia skrótowo antybiotyki pod kątem związków stosowanych w pracy, budowę, syntezę, właściwości i zastosowania kalisarenów, budowę i podstawowe modele błon biologicznych, ich składniki oraz funkcję. W dalszej części rozdziału omawia monowarstwy Langmuira jako model błon biologicznych, metody ich charakterystyki oraz zachodzące w nich przemiany fazowe w zależności od stężenia amfifilowych cząstek na granicy faz. Przystawia również dotychczasowe badania dotyczące monowarstw kaliksarenów, zwłaszcza ich kompleksów z jonami metali a także odnoszące się do oddziaływań kaliksarenów z membranami biologicznymi. Omówienie to pozwala na wprowadzenie czytelnika w tematykę pracy i wyjaśnia dlaczego doktorantka podjęła taką właśnie tematykę badawczą (z

zastrzeżeniem jak powyżej). W rozdziale tym można znaleźć pewne nieścisłości i nieprecyzyjne sformułowania. Na przykład:

- str. 1 - antybiotyki stosuje się głównie w terapiach antybakteryjnych, rzadziej antygrzybiczych i jedynie jako ewentualne leki wspomagające w terapiach antyrakowych;
- str 8 - raczej α -helisa niż α -heliksa;
- str 9 - dezynfekcja a nie dezynsekcja ran;
- str. 10 - przemysłu tworzyw sztucznych a nie plastikowego;
- str. 13 - ... stanu energetycznego, elektronowego, geometrycznego i sferycznego ?
- str. 14 - wiązania hydrofobowe (nieprecyzyjnie), jonowe v.s. elektrostatyczne ?
- str. 19 - ... prędkość przemieszczania się sąsiadujących cząsteczek jest rzędu 10^7 na sekundę (w jakich jednostkach ?);
- Rozdział II.3.1.2 - jednolite nazewnictwo albo rafty albo polskie tłumaczenie (nieszczęśliwe) - tratwy;
- str. 21 - mikroskopia ze skanującą sondą (STM ?), jest nią również AFM;
- str. 23 - dyfuzja - ruch cząsteczek w kierunku zgodnym ze spadkiem gradientu stężenia ???;
- str. 24 - ... charakter amfifilowy tzn. że są nierozpuszczalne w wodzie (!!);
- str. 37 - Rysunek 7 jest bardzo uproszczonym obrazkiem orientacji cząstek surfaktantu na granicy faz, co autorka przyznaje analizując przejścia fazowe w monowarstwach Langmuira;
- str. 39 - dyskusyjne jest stwierdzenie, że gęsto upakowane łańcuchy węglowodorowe przyjmują orientację pionową nad powierzchnią subfazy. W zależności od grupy polarnej łańcuchy mogą organizować się przyjmując określony kąt (tilt angle) względem powierzchni;
- str. 41 - zwykle jako potencjał powierzchniowy mierzony za pomocą wibrującej elektrody przyjmuje się wielkość $\cos \theta$ gdzie: θ jest składową prostopadłą do powierzchni efektywnego momentu dipolowego cząsteczki (jest to wielkość nadmiarowa) a ϵ jest stałą dielektryczną warstwy powierzchniowej. Ponieważ są to wielkości praktycznie niemierzalne, można składową momentu dipolowego zdefiniować jak to zostało zrobione w pracy.
- str. 42 - wzory 4 i 5 są błędne - czy na ich podstawie były liczone momenty dipolowe w dalszej części pracy, co to jest przewodnictwo dielektryczne (?);

W rozdziale III autorka przedstawia użyte materiały i metody badawcze. W szczególności pochodne kaliksarenu (p-tert-butylokaliks[4]arenu) z przyłączonym przez wiązanie estrowe jedna lub dwiema cząsteczkami kwasu naliksydowego oraz kaliks[4]aren z przyłączonymi czterema dodatnio naładowanymi grupami guanidynowymi oraz jego monomeryczny odpowiednik. Ze względu na kationowy charakter te ostatnie są dobrze

rozpuszczalne w wodzie. Wszystkie te związki nie są odczynnikami komercyjnymi a zostały pozyskane dzięki współpracy z Wydziałem Farmacji Uniwersytetu w Nancy. Badane kaliksareny charakteryzują się dobrze udokumentowaną aktywnością antibakteryjną. Jako lipidów błonowych doktorantka używa standardowych fosfolipidów t.j. fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy, fosfatydyloseryny oraz fosfatydyloglicerolu o długościach łańcuchów hydrofobowych 12-18 oraz z łańcuchem oleinowym jak również cholesterol. Do charakterystyki monowarstw doktorantka używa szeregu metod eksperymentalnych, wagi Langmira z pomiarem ciśnienia i potencjału powierzchniowego, mikroskopii kąta Brewstera jak również spektroskopii refleksyjno-absorpcyjnej w podczerwieni z modulacją polaryzacji PM-IRRAS. Przedstawione w pracy podstawy metod eksperymentalnych oraz metodologia prowadzenia pomiarów nie budzą zastrzeżeń.

Zasadnicza część pracy doktorskiej - „Zestawienia wyników i ich interpretacja” jest zawarta w rozdziale IV. Doktorantka zaczyna swoje omówienie od prezentacji wyników dotyczących kompleksowania jonów metali (kationów jedno i dwuwartościowych) przez naliksydowe pochodne kaliksarenu uzyskanych za pomocą modelowania molekularnego. Część ta budzi pewne wątpliwości. Na str. 74 autorka pisze: „Energie dla kaliksarenów i kationów zostały wyznaczone dla takich samych geometrii, jak w powstającym kompleksie inkluzyjnym”. Czy to znaczy, że za energie kaliksarenu przyjęto energie elektronową bez minimalizacji geometrii ? Dla uwzględnienia efektu rozpuszczalnika w modelowaniu autorka używa modelu PCM bez minimalizacji geometrii. Podejście takie nie jest poprawne, dlatego też powstrzymałbym się od dyskusji wyników dla tego modelu przedstawionych w Tabeli 5. Przedstawione tam rezultaty dla fazy gazowej również trudno użyć do interpretacji stabilności kompleksów w fazie wodnej. Należało by obliczyć energie (entalpię) swobodną z uwzględnieniem zmian hydratacji jonów w procesie tworzenia kompleksów. Nie jest dla mnie wiadomym dlaczego autorka nie korzysta w dalszej części pracy parametrów geometrycznych cząsteczek kaliksarenu i ich kompleksów, n.p. średnicy cząsteczki po optymalizacji geometrii, do interpretacji wyników doświadczalnych - izoterm ściskania monowarstw, porównując je na przykład z powierzchnią przypadającą na cząsteczkę w obszarze przejść fazowych, czy punkcie kolapsu. Po minimalizacji geometrii i obliczeniu energii elektronowej autorka powinna również dysponować danymi odnośnie molekularnych momentów dipolowych i ich modyfikacji na skutek tworzenia kompleksów z jonami metali co mogło posłużyć do interpretacji zmian izoterm potencjału powierzchniowego. W części dotyczącej porównania monowarstw kaliksarenów modyfikowanych pojedynczy (KI) i podwójnie pochodną naliksydową (KII)

doktorantka stwierdza, że monowarstwa KII charakteryzuje się większym współczynnikiem ściśliwości oraz większą stabilnością od warstwy KI oraz przejściem fazowym LE-LC co prawidłowo tłumaczy bardziej kompaktową strukturą KII. Natomiast tłumaczenie większego efektywnego momentu dipolowego KII w stosunku do KI różnicą w odchyleniu osi cząsteczki od normalnej do powierzchni nie jest wystarczające bez informacji czy faktycznie wektor momentu dipolowego jest kolinearny z osią dla obu pochodnych i czy są one porównywalne - informacje, te można było uzyskać na podstawie modelowania molekularnego. Charakteryzując monowarstwy kaliksarenów na roztworach soli autorka analizuje wpływ tworzenia kompleksów z kationami metali na przebieg izoterm ściskania monowarstw. Wpływ ten wydaje się niewielki (jaka była powtarzalność izoterm ?) za wyjątkiem pochodnej KI i jonów Ca^{2+} i Cu^{2+} . Interpretując przebieg izoterm potencjału powierzchniowego autorka słusznie zauważa, że należy uwzględnić wpływ tworzenia kompleksów na efektywny moment dipolowy cząsteczek a zmian nie można tłumaczyć tylko efektem orientacji. Uzyskane wyniki analizy PM-IRRAS są zgodne z interpretacją autorki dla izoterm ściskania monowarstw KI i KII i ich kompleksów z kationami K^{+} (zaniedbywalny wpływ na konformacje monowarstw), Ca^{2+} i Cu^{2+} . Na podstawie analizy wyników przedstawionych w tej części rozprawy doktorskiej autorka wysnuwa wniosek, że monopodstawiona pochodna kaliksarenu jest lepszym kandydatem do roli nośnika leku ze względu na tworzenie międzymolekularnych kompleksów które będą silniej modyfikować membranę komórkową i z których kwas naliksydowy może być łatwiej uwalniany.

W następnym podrozdziale doktorantka charakteryzuje oddziaływania w monowarstwach Langmuira pomiędzy pochodnymi kaliksarenu KI i KII i cholesterolem. Skupia się na zależności przebiegu izoterm ściskania monowarstw od ułamka molowego cholesterolu. Określa parametry izoterm i zależności współczynnika ściśliwości od powierzchni przypadającej na cząsteczkę. Zgodnie z oczekiwaniami dla warstw idealnie mieszalnych obserwuje monotoniczne zmiany pomiędzy izotermami o kształcie charakterystycznym dla kaliksarenu i izotermami charakterystycznymi dla cholesterolu przy czym wpływ kalisarenu jest dominujący (geometria !). Proces prawie idealnego mieszania potwierdza znajdując zależność średniej powierzchni cząsteczkowej od ułamka molowego cholesterolu w monowarstwie. Wskazuje ona na słabe oddziaływania odpychające prawdopodobnie wynikające z hydratacji. Natomiast wniosek odnośnie kondensującego wpływu cholesterolu na warstwy wysunięty na podstawie krzywych kompresji monowarstwy potwierdza obserwacjami mikroskopii BAM. Absolutnie nie przekonuje mnie interpretacja

zależności średniego potencjału powierzchniowego od ułamka molowego cholesterolu. Nawet w przypadku idealnego mieszania efektywne momenty dipolowe nie muszą być addytywne, a odstępstwo od addytywności trudno interpretować jako efekt oddziaływań. Otrzymane zależności wymagają dalszej interpretacji z uwzględnieniem indywidualnych momentów dipolowych cząsteczek.

Kolejny podrozdział poświęcony jest analizie oddziaływań kaliks[4]arenu z przyłączonymi czterema grupami guanidynowymi (CX) i jego monomerycznego odpowiednika (mCX) z monowarstwami fosfolipidowymi tworzonymi na powierzchni roztworu. Modyfikowany kaliksaren ze względu na pozorny dodatni ładunek elektryczny jest dobrze rozpuszczalny w wodzie; podobnie jego monomer. Dlatego zastanawiający jest rysunek 40, który sugeruje, że do pomiaru aktywności powierzchniowej CX i mCX użyto wagi Langmuira (przy jakich stężeniach), która to technika do tego się nie nadaje. Aktywność powierzchniową należało ocenić mierząc izotermę adsorpcji (metoda płytki Wilhelmiego lub wiszącej kropli). Metodą wagi Langmuira poprawnie wyznaczono krzywe kompresji na czystej wodzie dla czterech fosfolipidów o tej samej części hydrofobowej a różniących się grupą hydrofilową: zwitterjonową (bijonową) DMPC i DMPE oraz anionową DMPS i DMPG i określono ich charakterystyczne parametry a następnie porównano z krzywymi kompresji na subfazie wodnej zawierającej trzy różne stężenia CX i jedno stężenie mCX odpowiadające tej samej zawartości molowej grup guanidynowych. O ile wpływ CX na krzywe kompresji warstw fosfolipidów zwitterjonowych był niewielki o tyle, zgodnie z oczekiwaniami, dla fosfolipidów anionowych zmienił się zarówno zakres jak i charakter krzywych. Dla pochodnej CX w roztworze przypominał krzywe kompresji kaliksarenów w monowarstwie. Autorka właściwie zinterpretowała obserwowane zmiany jako efekt silnego oddziaływania czterododatniego kaliksarenu z monowarstwą anionowych fosfolipidów. Wniosek ten jest potwierdzony przez raptowny wzrost potencjału powierzchniowego spowodowany częściową neutralizacją ujemnego ładunku grup hydrofilowych fosfolipidów przez dodatnie grupy guanidynowe. W rezultacie zachodzi również upłynnienie monowarstw poprzez redukcję oddziaływań elektrycznych. Duży wpływ CX na właściwości warstw anionowych lipidów może tłumaczyć jego silne właściwości antybakteryjne. Z kolei monomeryczny mCX miał znacząco mniejszy wpływ na właściwości monowarstw co dobrze koreluje się z brakiem istotnej aktywności antybakteryjnej. Metodą mikroskopii kata Brewstera doktorantka scharakteryzowała strukturę warstw fosfolipidowych DMPE i DMPG w zależności od pola powierzchni przypadającego na cząsteczkę dla szeregu wartości ciśnienia powierzchniowego, identyfikując skład fazowy

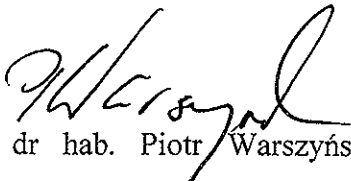
monowarstw a następnie prześledziła jak struktura zmienia się w obecności CX i mCX. Wyniki potwierdziły obserwacje uzyskane na podstawie analizy krzywych kompresji. Również analiza widm PM-IRRAS potwierdziła zmiany konformacyjne i oraz związane z hydratacją grup których pasma obserwowała, natomiast zaproponowany na podstawie otrzymanych wyników model penetracji CX do warstwy lipidowej jest co najmniej dyskusyjny. Ze względu na hydrofilowy charakter pochodnej CX, recenzent gotów jest zaproponować model alternatywny z koordynacją czterech fosfolipidów na jedną cząsteczkę CX z grupami OH skierowanymi w stronę wody i ściślejszym upakowaniem na powierzchni. Konfiguracja zaproponowana na rysunku 53C,D jest zbyt przestrzenna w stosunku do wyników krzywej kompresji przedstawionych na rys 42C. Zgodnie z oczekiwaniami wpływ długości łańcucha hydrofobowego dla zwitterjonowej fosfatydyloetanolaminy jest niewielki natomiast istotny dla anionowego fosfatydyloglicerolu. Ulega zmianie zarówno zakres jak i charakter krzywych kompresji. Wyniki PM-IRRAS niebicie udowodniły największy stopień nieuporządkowania monowarstw fosfolipidów z łańcuchami oleinowymi jak również wypieranie kaliksarenu z monowarstw fosfolipidów anionowych przy dużych ciśnieniach powierzchniowych gdy oddziaływania elektryczne mogą zostać zrównoważone poprzez oddziaływania van der Waalsa pomiędzy długimi łańcuchami hydrofobowymi.

Dominujący wpływ oddziaływań elektrycznych pomiędzy anionowymi fosfolipidami a kationowo modyfikowanym kaliksarenem doktorantka zademonstrowała w cyklu eksperymentów dotyczących charakterystyki mieszanin DOPE/DOPG. Otrzymane wyniki dla krzywych kompresji i widm PM-IRRAS prowadzą do spójnych wniosków.

W rozdziale V doktorantka podsumowuje wnioski uzyskane na podstawie otrzymanych wyników eksperymentalnych. Można się z nią zgodzić, że badania przeprowadzone z wykorzystaniem warstw Langmuira przeprowadzone w trakcie opracowywania rozprawy doktorskiej dostarczyły wielu informacji na temat struktury monowarstw kaliksarenowych i wpływu kompleksowania jonów metali na tę strukturę a także na temat mechanizmu oddziaływań w monowarstwie kaliksarenu z cholesterolem. Według recenzenta szczególnie wartościową jest część pracy poświęconej penetracji wodnorozpuszczalnej kationowej pochodnej kaliksarenu do monowarstw fosfolipidowych, a jej wyniki można powiązać z aktywnością biologiczną badanych związków.

Praca jest solidnie zredagowana i wyedytowana, chociaż w egzemplarzu recenzenta zdarzył się zduplikowany spis treści i 1.5 listy symboli. Rysunki są czytelne i pomocne w interpretacji wyników.

Podsumowując, doktorantka zebrała bardzo obszerny materiał eksperymentalny solidnie podbudowany wiedzą literaturową. Trafnie dobrała metody doświadczalne, które dostarczyły komplementarnych informacji. Niekiedy wyciągała zbyt daleko idące wnioski zwłaszcza na podstawie zależności wyznaczonych dla potencjałów powierzchniowych, które powinny zostać ponownie zinterpretowane na podstawie solidnej podbudowy teoretycznej. Jest to raczej wskazówka na przyszłość niż zarzut albowiem pozostałe wyniki i ich dyskusję oceniam bardzo pozytywnie. Niektóre uwagi zgłoszone w recenzji mają charakter polemiczny i recenzent oczekuje, że doktorantka podejmie się dyskusji w trakcie obrony. Inne zarzuty o charakterze technicznym nie obniżają mojej wysokiej oceny zebranego materiału doświadczalnego i całokształtu rozprawy. Stwierdzam, że dysertacja Pani mgr Moniki Orlof spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuje o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Piotr Warszński