



**Dr hab. Paweł Wydro, prof. UJ**  
UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI w KRAKOWIE, WYDZIAŁ CHEMII  
Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii  
Zespół Fizykochemii Powierzchni  
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków  
tel. (12) 686-25-19  
e-mail: wydro@chemia.uj.edu.pl

Kraków, 16.09.2019

### *Recenzja*

*rozprawy doktorskiej Pani mgr Doroty Konarzewskiej*

*pt. „Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych”*

Do chwili odkrycia i zastosowania penicyliny, która zrewolucjonizowała leczenie zakażeń bakteryjnych, choroby powodowane przez bakterie były jednymi z tych, które powodowały największą śmiertelność i ciężkie powikłania u setek milionów ludzi. W kolejnych latach XX wieku pojawiły się nowe naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne antybiotyki o bardzo szerokim spektrum działania i wydawało się, że problem chorób wywoływanych przez bakterie jest pod pełną kontrolą. Jak szybko się okazało, nadzieje te były płonne, gdyż nadużywanie antybiotyków, ich nieprawidłowe stosowanie oraz wrodzone i ewolucyjnie nabyte mechanizmy obronne mikroorganizmów sprawiły, że pojawiły się szczepy bakterii, które są niewrażliwe na większość znanych leków. Lekooporność bakterii, a zwłaszcza oporność wielolekowa, jest poważnym problemem, gdyż coraz częściej pojawiają się przypadki śmiertelne wywołane zakażeniami bakteryjnymi, które wydawały się całkowicie wyleczalne. Dlatego naukowcy na całym świecie poszukują nowych leków, które byłyby skuteczne w leczeniu różnego typu infekcji bakteryjnych. Dużym wyzwaniem jest również poznanie mechanizmu działania nowo zsyntezowanych lub wyizolowanych substancji, co pozwoliłoby na ukierunkowanie syntezy nowych skutecznych antybiotyków. W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się tematyka badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Doroty Konarzewskiej.

Rozprawa doktorska mgr Doroty Konarzewskiej wykonana została na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w Pracowni Teorii i Zastosowania Elektrod pod kierunkiem Pana dr hab. Sławomira Sęka, prof. UW. Praca doktorska zredagowana została w języku polskim, na 188 stronach maszynopisu, według klasycznego układu formalnego charakterystycznego dla prac doświadczalnych. Rozprawę rozpoczyna streszczenie w języku polskim i angielskim oraz cel pracy, po którym następuje część literaturowa i doświadczalna. Dalej Autorka zamieściła

podsumowanie, w którym zebrane są najważniejsze wnioski płynące z Jej badań oraz spis cytowanej literatury.

Pierwsza część pracy, w której Autorka dokonała przeglądu literatury podzielony został na 5 głównych rozdziałów. W pierwszym z nich autorka opisała skład lipidowy, a także budowę i funkcję błon komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem różnic w budowie membran komórkowych bakterii gram-dodatnich oraz gram-ujemnych. Kolejny rozdział tej części pracy Pani mgr Dorota Konarzewska poświęciła omówieniu problemu oporności bakterii na antybiotyki, a także budowie, charakterystyce i zastosowaniu lipopeptydów jako substancji antybakteryjnych. W trzecim z rozdziałów części literaturowej pracy Autorka scharakteryzowała etapy wdrażania nowych leków i omówiła metody laboratoryjne podstawowych badań mikrobiologicznych umożliwiającących określenie stanu wzrostu hodowli komórek bakteryjnych oraz wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC). W dwóch ostatnich rozdziałach tej części rozprawy omówione zostały podstawy fizykochemiczne technik eksperymentalnych wykorzystywanych przez Autorkę oraz metody wytwarzania warstw lipidowych na stałych podłożach.

Licząca 67 stron część literaturowa pracy przygotowana została w oparciu o 278 publikacji naukowych z czego przeważającą część stanowią prace, które ukazały się po 2000 roku. Prezentowane w tej części pracy zagadnienia zostały jasno i wyczerpująco omówione, co pozwala mi stwierdzić, że Doktorantka posiada dobrą znajomość aktualnego stanu wiedzy w obszarze związanym z tematyką badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Należy podkreślić, że wybór i kolejność zagadnień zaprezentowanych przez Autorkę w literaturowej części pracy doktorskiej stanowi logiczną całość, a także uzasadnia wartość naukową i aktualność podjętych badań.

W drugiej, eksperymentalnej części pracy Autorka przedstawiła stosowane materiały i odczynniki, opisała metody pomiarowe i wykorzystaną aparaturę. W kolejnych rozdziałach tej części pracy mgr Dorota Konarzewska w sposób bardzo przejrzysty i jasny zaprezentowała wyniki swoich badań i przeprowadziła ich dogłębną analizę wyprowadzając jednocześnie szereg wniosków o dużej wartości naukowej. Na uwagę zasługuje duża ilość nowoczesnych technik badawczych zastosowanych przez Autorkę pracy jak również Jej umiejętność prawidłowego planowania eksperymentów, dzięki czemu Autorce udało się uzyskać szczegółowy wgląd w strukturę modelowych membran i ich oddziaływania z badanymi lipopeptydami. Warto również podkreślić, że mgr Dorota Konarzewska nie tylko przedstawiła wyniki swoich badań, lecz również je przedyskutowała na tle dostępnej literatury. W tym

miejscu chciałbym zaznaczyć, że wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w zakresie wytwarzania dwuwarstw lipidowych na stałych podłożach, jak również dają głębszy wgląd w mechanizm oddziaływania lipopeptydów z modelowymi błonami komórkowymi.

Do najważniejszych osiągnięć doktorantki zaliczyłbym:

1. Wykazanie, że w zakresie ciśnień powierzchniowych 30-35 mN/m w mieszanej monowarstwie utworzonej z lipidów (fosfatydyloetanolamin i fosfatydylogliceroli, PE:PG = 8:2) pochodzących z błon komórkowych bakterii *E. coli* formowane są domeny o wyższej kondensacji w stosunku do pozostałej matrycy monowarstwy.
2. Potwierdzenie występowania zjawiska separacji fazowej w dwuwarstwie lipidowej utworzonej na powierzchni miki dla wyżej wspomnianej mieszaniny lipidów.
3. Wykazanie wpływu podłoża na morfologię i właściwości nanomechaniczne dwuwarstwy lipidowej.
4. Wykazanie, że dla układu POPG:DPPG:CL (1:1:2) reprezentującego membranę lipidową bakterii gram dodatniej *S. aureus*, pomiędzy dwuwarstwą lipidową a monowarstwą tioglukozy tworzy się rezerwuar wodny, który znacząco wpływa na właściwości nanomechaniczne modelowej membrany.
5. Dowiedzenie istnienia korelacji pomiędzy wartościami modułu Younga wyznaczonymi dla badanej membrany i stopniem hydratacji dwuwarstwy.
6. Wykazanie, że daptomycyna wbudowuje się w modelową błonę bakteryjną zmieniając jej przepuszczalność dla jonów i cząsteczek wody.
7. Wykazanie, że w przypadku kompresji monowarstw na roztworach zawierających badane lipopeptydy dochodzi do ich wbudowywania w modelowe membrany bakteryjne, co powoduje ich upłynnienie i zmniejszenie ich uporządkowania.
8. Udowodnienie, że badane lipopeptydy adsorbują się w rejonie głów polarnych skondensowanych monowarstw lipidowych lecz ich nie penetrują, co może tłumaczyć ich niską skuteczność wykazaną w badaniach mikrobiologicznych.

Analiza przedstawionych w pracy wyników, ich dyskusja i wnioski wskazują, że Autorka rozprawy zrealizowała wszystkie założone cele badawcze. Co więcej, wyniki otrzymane na podstawie dobrze zaplanowanych i rzetelnie wykonanych eksperymentów zostały wnikliwie i prawidłowo zinterpretowane w oparciu o dobrze dobraną aktualną literaturę naukową. Poza wysokim poziomem merytorycznym rozprawy doktorskiej Pani mgr Doroty Konarzewskiej,

chciałbym podkreślić również bardzo wysoką jakość edycyjną pracy. Widać, że praca została przygotowana starannie z dużą dbałością o szczegóły, co przejawia się w klarownych opisach i dyskusji jak również bardzo estetycznych, czytelnych grafikach. W trakcie lektury pracy napotkałem kilka błędów literowych i stylistycznych, których nie będę przytaczał gdyż uważam, że w tak długich opracowaniach są one właściwie nie do uniknięcia. Jednocześnie, z obowiązku recenzenta, chciałbym wskazać pewne nieścisłości i sformułować kilka uwag polemicznych:

1. Na stronie 18 Autorka napisała, że błona komórkowa to struktura płynna i dynamiczna składająca się z podwójnej warstwy lipidowej, w którą wbudowane są białka „...które stanowią około 50% całkowitej zawartości błony”. Czy Autorka miała na myśli procenty wagowe czy molowe?
2. Na stronie 20 Autorka napisała „Lipidy wykazują charakter hydrofobowy.” podczas gdy cząsteczki lipidów w swojej strukturze zawierają zarówno część hydrofobową jak i hydrofilową czyli mają charakter amfifilowy.
3. W rozdziale V (Metodyka pomiarów) Autorka szczegółowo opisała fizykochemiczne podstawy stosowanych przez siebie technik badawczych. Warto byłoby również w tym rozdziale umieścić mikroskopię kąta Brewstera (BAM), którą Autorka również wykorzystywała w swoich badaniach.
4. Wobec oznaczeń przyjętych przez Autorkę we wzorach na stronie 59, wartość nadmiarowej powierzchni mieszania powinna zawsze wynosić zero. Wynika to z konfliktu oznaczenia poszczególnych parametrów. Tak naprawdę pierwsze z równań pozwala na wyznaczenie wartości średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w mieszanej monowarstwie przy założeniu idealnego mieszania się składników i powinna być oznaczona np. jako  $A_{12}^{id}$ , a wielkość  $A_{12}$  jest rzeczywistą wartością wyznaczoną z izotermy kompresji monowarstwy mieszanej. Warto byłoby również wspomnieć w tym miejscu, że parametry te odpowiednio oblicza się i wyznacza dla danej (tej samej) wartości ciśnienia powierzchniowego.
5. Nieścisły jest również opis dotyczący fizycznego sensu wynikającego z wartości nadmiarowej powierzchni mieszania (str. 59) i nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania (str. 60). W opisach tych Autorka napisała, że ujemne wartości tych parametrów świadczą o oddziaływaniach przyciągających, a dodatnie o oddziaływaniach odpychających pomiędzy cząsteczkami tworzącymi mieszaną monowarstwę. W istocie oba parametry są funkcjami nadmiarowymi i ich wartość ściśle

zależy od przyjętego układu odniesienia, którym może być układ doskonały (idealny) lub układ idealny rozcieńczony w wariacie symetrycznym i niesymetrycznym. W przypadku monowarstw Langmuira układem odniesienia jest układ idealny dla wszystkich składników monowarstwy (symetryczny układ odniesienia). Oznacza to, np. że wartości  $A^{exc}$  i  $\Delta G^{exc}$  są ujemne, w przypadku gdy oddziaływania pomiędzy cząsteczkami składników monowarstwy mieszanej są silniej przyciągające lub słabiej odpychające w porównaniu do oddziaływań międzycząsteczkowych w odpowiednich monowarstwach jednoskładnikowych.

Nie zawsze również dodatnie wartości nadmiarowej entalpii swobodnej mieszania muszą oznaczać separację fazową w układzie.

6. W części eksperymentalnej pracy, w podrozdziale dotyczącym aparatury badawczej, Autorka wspomniała, że barierki wanny Langmuira wykonane były z teflonu, podczas gdy producent standardowo dostarcza urządzenie, w którym barierki wykonane są z hydrofilowego materiału (Delrin) uniemożliwiającego „wyciekanie” monowarstwy pod barierkami.
7. W tabeli 7 oraz pozostałych tabelach, w których zebrane są parametry wyznaczone na podstawie izoterm  $\pi$ -A, przedstawione są wartości średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę lipidu w monowarstwie. Niestety nie znalazłem wyjaśnienia czy są to wartości wyznaczone przy danym ciśnieniu powierzchniowym czy uzyskane na drodze ekstrapolacji?
8. Czy w badaniach penetracji lipopeptydów do monowarstwy skompresowanej do ciśnienia powierzchniowego 35 mN/m eliminowano efekt związany z dyfuzją lipopeptydów do granicy międzyfazowej?

Chciałbym, w tym miejscu zaznaczyć, że powyższe uwagi, mają charakter polemiczny i nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę całej pracy. W mojej ocenie praca doktorska Pani mgr Doroty Konarzewskiej pt. „*Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych*” spełnia wszystkie zwyczajowe i prawne kryteria stawiane pracom doktorskim zgodnie z artykułem 13 ustawy z dn. 14.03.2003 (z późniejszymi zmianami) *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 ze zmianą w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę dużą wartość naukową uzyskanych wyników, które zostały już w większości opublikowane w postaci 3 artykułów naukowych w uznanych specjalistycznych czasopismach naukowych (Langmuir – 2 prace, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes – 1 praca) oraz duży nakład pracy włożony przez Doktorantkę w przygotowanie rozprawy wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. H. 10'.



**Dr hab. Paweł Wydro, prof. UJ**  
UNIwersytet Jagielloński w KRAKOWIE, WYDZIAŁ CHEMII  
Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii  
Zespół Fizykochemii Powierzchni  
ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków  
tel. (12) 686-25-19  
e-mail: wydro@chemia.uj.edu.pl

Kraków, 16.09.2019

***Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej***

***Pani mgr Doroty Konarzewskiej***

***pt. „Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych”***

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Doroty Konarzewskiej stanowi bardzo interesujące opracowanie wpisujące się w nurt badań podstawowych mających na celu wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania lipopeptydów z modelowymi membranami komórkowymi w kontekście poszukiwania nowych leków antybakteryjnych. Rozprawa ta reprezentuje wysoki poziom naukowy, a uzyskane przez Autorkę wyniki mają dużą wartość poznawczą i wnoszą znaczący wkład w poznanie antybakteryjnego działania lipopeptydów, a także w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w zakresie wytwarzania dwuwarstw lipidowych na stałych podłożach. Na uwagę zasługuje duża ilość nowoczesnych technik badawczych zastosowanych przez Autorkę pracy jak również Jej umiejętność prawidłowego planowania eksperymentów. Poza wysokim poziomem merytorycznym rozprawy doktorskiej Pani mgr Doroty Konarzewskiej, chciałbym podkreślić również bardzo wysoką jakość edycyjną pracy. Widać, że praca została przygotowana starannie z dużą dbałością o szczegóły, co przejawia się w klarownych opisach i dyskusji jak również bardzo estetycznych, czytelnych grafikach.

Warto również podkreślić, że mgr Dorota Konarzewska, w swojej rozprawie doktorskiej, nie tylko przedstawiła wyniki swoich badań, lecz również je przedyskutowała na tle dostępnej literatury. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki, ze względu na aktualność tematu, mają ogromną wartość naukową i zostały już w większości opublikowane w postaci 3 artykułów naukowych w specjalistycznych opiniotwórczych czasopismach o międzynarodowym zasięgu (Langmuir – 2 prace, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes – 1 praca).

Biorąc pod uwagę powyższe jak również duży nakład pracy włożony przez Doktorantkę w przygotowanie rozprawy wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.