



POLITECHNIKA WARSZAWSKA

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Prof. dr hab. inż. Kamil Wojciechowski

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel/fax.: 22-234-5106, E-mail: kamil.wojciechowski@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2019-09-19

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Doroty Konarzewskiej

"Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska „*Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych*” autorstwa mgr Doroty Konarzewskiej zrealizowana została pod kierunkiem dr hab. Sławomira Sęka, prof. uczelni na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Praca dobrze wpisuje się zarówno w tematykę zespołu badawczego „Laboratorium Fizykochemii Powierzchni” kierowanego przez prof. Sławomira Sęka, jak i w aktualne kierunki badań biofizycznych na świecie. Autorka postawiła sobie za główny cel zbadanie wpływu wybranych lipopeptydów na modelowe mono- i dwuwarstwy lipidowe naśladujące składem błony biologiczne bakterii Gram+ i Gram-. Do badań Autorka wybrała lipopeptyd o znanej aktywności biologicznej, dopuszczony jako tzw. antybiotyk ostatniej szansy – daptomycynę, ale także nowo zsyntezowane pochodne batacyny, których aktywność biologiczna i powierzchniowa nie była dotąd znana. Wobec realnej groźby wzrostu liczby szczepów bakterii antybiotykoopornych tematyka badań opisanych w rozprawie jest jedną z najbardziej aktualnych.

Recenzowana praca napisana została w języku polskim i składa się z części literaturowej (68 stron) i części zawierającej wyniki własne (91 stron), a także spisu treści, celu badań, streszczenia (w języku angielskim i polskim) oraz bibliografii (278 pozycji). Rozprawa jest bogato ilustrowana rysunkami i tabelami, co ułatwia zrozumienie opisywanych wyników. Każdy rozdział części eksperymentalnej kończy się syntetycznym podsumowaniem wyciągniętych wniosków. Również kodowanie aminokwasów za pomocą kolorów na rysunkach przedstawiających struktury lipopeptydów bardzo ułatwia lekturę rozprawy. Mimo drobnych błędów językowych, od strony edycyjnej praca przygotowana jest dobrze.

Część literaturowa rozpoczyna się od wyjaśnienia najważniejszych z punktu widzenia pracy pojęć związanych z bakteriami, ich błonami komórkowymi oraz różnicami między szczepami Gram+ i Gram-. Druga część przeglądu literatury opisuje problem antybiotykooporności oraz charakteryzuje

lipopeptydy antybakteryjne, ze szczególnym uwzględnieniem daptomycyny i batacyny, będących obiektami zainteresowań naukowych Kandydatki. W ostatniej części przeglądu literatury Autorka opisuje wykorzystane w pracy metody badawcze. Chociaż nie wszystkie badania wykonywała osobiście (co zostało uczciwie i wyraźnie w pracy zaznaczone), w tym miejscu warto podkreślić ich dużą różnorodność – od metod typowo mikrobiologicznych (minimalne stężenie hamujące, badanie kinetyki wzrostu kolonii bakterii), poprzez elektrochemiczne (woltamperometria, spektroskopia impedancyjna), do zaawansowanych metod analizy powierzchni (mikroskopia sił atomowych, mikrowaga kwarcowa, spektroskopia w podczerwieni ze wzmocnieniem powierzchniowym). Analiza i interpretacja tak różnorodnych danych z pewnością świadczy o dojrzałości naukowej mgr Doroty Konarzewskiej.

Część eksperymentalna rozpoczyna się od wykazu odczynników i użytej aparatury oraz opisu procedur eksperymentalnych. Następnie Autorka opisuje wyniki kolejnych projektów składających się na rozprawę. Rozdział VIII, zatytułowany „Charakterystyka biomimetycznej membrany lipidowej zbudowanej z fosfatydyloetanolamin i fosfatydylogliceroli pochodzących z bakterii *Escherichia coli*” wyraźnie odróżnia się od pozostałych, zarówno pod względem doboru lipidów, jak i sposobu tworzenia dwuwarstw. Autorka porównała dwuwarstwy tworzone na mice i na złocie wskazując na istotne różnice rzutujące na reprezentatywność wyników badań w zależności od podłoża. Zastosowanie mieszanki lipidów pozyskanych z ekstraktów z bakterii *E. coli* i nieco innej metodyki badań (w tym również innego buforu pH) nie pozwala jednak na bezpośrednie porównanie wyników z tymi opisywanymi dla kolejnych układów. Ponieważ wnioski wyciągnięte na końcu tego rozdziału doprowadziły do znacznych zmian w procedurach kolejnych badań, moim zdaniem rozdział ten lepiej byłoby potraktować jako badania wstępne i ograniczyć wnioski do ustalenia procedury dalszych badań. Uwagi tej nie należy jednak traktować jako krytyki stosowania ekstraktów lipidów (wręcz przeciwnie – gdyby tylko ekstrakty z innych bakterii były dostępne komercyjnie, byłby to z pewnością lepszy model ich błon komórkowych), a raczej jako wskazanie pewnej niespójności. W badaniach opisanych w dalszych rozdziałach Autorka stosuje już mieszanki lipidów o prostszym składzie, zawierające po 3-4 składniki o określonych i znanych strukturach chemicznych. Podejście to ma niewątpliwą zaletę możliwości kontroli składu modelowych membran, ale z drugiej strony – na ile poszczególne mieszanki lipidów są rzeczywiście reprezentatywne dla sugerowanych gatunków bakterii? Niestety Autorka nie ułatwia odpowiedzi na tak postawione pytanie, ponieważ w pracy nie udało mi się znaleźć odnośników literaturowych, na podstawie których dokonano wyboru składów modelowych mieszanin. Pewną wskazówkę może stanowić Tabela 3, ale nie zawsze zaproponowane składki modelowych mieszanek lipidów odpowiadają tym podanym w Tabeli. Poza tym są w niej dane dotyczące tylko charakteru „głów” fosfolipidów, a o charakterze mono- czy dwuwarstwy często decyduje również długość i stopień nienasycenia łańcuchów acylowych.

Rozdział IX stanowi moim zdaniem najbardziej kompletną i rozbudowaną część recenzowanej rozprawy. Wykorzystano w nim tzw. pływającą dwuwarstwę lipidową stanowiącą obiekt

intensywnych badań opisywanych w najnowszej literaturze biofizycznej. Niewątpliwie wyniki zamieszczone w tej części stanowią bardzo ważny wkład w badania natury dwuwarstw tworzonych na powierzchni złota, nie tylko w obecności elektrolitu (bufor pH, jony Ca^{2+}), ale także w obecności daptomycyny. Pewien niedosyt pozostawia jedynie brak dyskusji nad rolą jonów Ca^{2+} , ale rozumiem, że jest to zagadnienie na tyle szerokie, że wykraczało poza ramy niniejszej pracy.

W rozdziale X, Autorka porównała nowo zsyntezowane lipopeptydy będące pochodnymi batacyny pod względem ich działania na trzy modelowe monowarstwy zawierające odpowiednie mieszanki lipidów (POPE, DPPG, POPG, CL), którym przypisano reprezentatywność dla błon bakterii Gram- (*E. coli* i *P. aeruginosa*) oraz Gram+ (*S. aureus*). Wyniki te również dostarczają cennych informacji na temat oddziaływania badanych lipopeptydów z lipidami w monowarstwach – mimo niewielkich stężeń potrafią bardzo znacząco modyfikować kształt izoterm kompresji i podwyższać ciśnienie powierzchniowe w skompresowanych monowarstwach. W tym rozdziale zabrakło mi porównania z wynikami opisanymi w literaturze. Autorka powołuje się m.in. na pracę De Zoysa i innych [119], gdzie opisano inne pochodne batacyny, ale nie komentuje jak wyniki z ich pracy korelują z tymi opisanymi w rozprawie.

Do najważniejszych zalet przedstawionej do recenzji rozprawy zaliczyłbym systematyczne podejście do rozwiązywanego problemu. W każdym przypadku analizowana kombinacja: mieszanina lipidów-pochodna batacyny charakteryzowana jest według tego samego schematu (charakteryzacja monowarstwy na subfazie bez lipopeptydu, a następnie z lipopeptydami, oraz badanie dynamiki wpływu tych lipopeptydów na wartość ciśnienia powierzchniowego skompresowanej monowarstwy). W przypadku analizy mechanizmu działania daptomycyny, badania te zostały dodatkowo rozszerzone o układy dwuwarstw lipidowych. Mimo, że wyniki badań nad pochodnymi batacyny nie wykazały korelacji między aktywnością biologiczną a powierzchniową, na wyróżnienie zasługuje fakt, że Autorka dołożyła wszelkich starań, aby badania tych pochodnych prowadzić w sposób systematyczny – analizując pochodne, w których każdorazowo zmieniano jednocześnie tylko jeden element budowy (liczbę reszt kwasu diaminomasłowego). Na wyróżnienie zasługuje również wykorzystanie przez mgr Dorotę Konarzewską komplementarnych informacji, np. topografii dwuwarstwy i jej właściwości nanomechanicznych. Badania te wniosły znaczący wkład do zrozumienia różnic w mechanizmie osadzania dwuwarstw lipidowych na powierzchniach o różnej hydrofilowości (mika vs Au). Za bardzo ważne należy uznać również wyniki badań zachowania cząsteczek wody w sąsiedztwie dwuwarstwy osadzonej na elektrodzie złotej w funkcji przyłożonego potencjału. Zaprezentowana interpretacja jest przekonująca i bardzo ciekawa, jednak w dyskusji zabrakło mi jeszcze bardziej przekonujących argumentów potwierdzających, że obserwowane zmiany w różnicowych widmach SEIRA wynikają tylko ze zmiany ilości wody w warstwie pośredniej między powierzchnią złota a dwuwarstwą. Czy można wykluczyć, że obserwowane zmiany w zakresie drgań grup -OH dotyczą (również) cząsteczek wody hydratujących głowy lipidów z warstwy zewnętrznej (od strony elektrody pomocniczej) i/lub wynikają ze zmian stężenia jonów

Ca²⁺ powodowanych polaryzacją elektrody ? Czy można również wykluczyć, że przyczyną obserwowanych zmian w intensywności pasm -OH są zmiany orientacji dipoli cząsteczek wody (a nie ich liczby) pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego (zgodnie z powierzchniowymi regułami wyboru) ? W takim przypadku wzrost intensywności pasm być może nie musiałby oznaczać zwiększenia ilości wody, a jedynie zmianę orientacji jej cząsteczek.

Przy ogólnej wysokiej ocenie rozprawy, chciałbym również zwrócić uwagę na drobne niejasności znalezione w pracy (w niektórych przypadkach będące tylko moimi subiektywnymi opiniami). Z obowiązku recenzenta przytaczam je poniżej:

- 1) W połączeniach z rzeczownikami policzalnymi powinno się stosować słowo „liczba”, a nie „ilość” („(...) z różnych ilości reszt kwasu L-2,4-diaminomasłowego” – str. 6; „(...) narząd ruchu w postaci jednej lub większej ilości wici” – str. 17; „(...) posiadają dużą ilość wiązań nienasyconych” -str. 21; „rozpraszana przez większą ilość cząstek (...)” – str. 54)
- 2) Pojęcie „gęstości optycznej”, na które powołuje się Autorka w rozdziale II.3.1 jest stosowane w biologii, ale z punktu widzenia rozprawy w dziedzinie chemia powinno się raczej posługiwać pojęciami zjawisk (absorpcja i załamanie wiązki promieniowania).
- 3) Prawdopodobnie z powodu pośpiesznej edycji zdanie ze str. 34 „Błona zewnętrzna zbudowana jest z białek oraz lipopolisacharydu (LPS) [24]” sugeruje, że w błonach tych nie występują inne składniki (np. fosfolipidy), co nie jest prawdą.
- 4) W tabeli 3 brakuje jednostek, a ponieważ nie wszystkie kolumny sumują się do 100, nie wiadomo, czy podane wartości odnoszą się do %.
- 5) Trudno jest rozszyfrować sens niektórych zdań, np. „Miejsce nienasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach bakteryjnych, które bardzo często występują u *Eukaryotów*, zajmują nasycone i rozgałęzione kwasy tłuszczowe” – str. 36; „Pokrewny lipopeptyd – Pam3CysSerSer – uczestniczy w pośredniczeniu w przyłączaniu się do błony komórkowej (...)” – str. 43, czy „Gdy światło zostaje rozproszone przez pojedynczą cząstkę w zawiesinie, tłumienie światła (czyli tym samym wymieranie bakterii) jest proporcjonalne do liczby cząstek [137]” – str. 54.
- 6) Niektóre fragmenty tekstu zawierają błędne lub zbyt dosłowne tłumaczenia fragmentów artykułów, np. „N-koniec tłuszczowego łańcucha acylowego został zastąpiony przez perylenowy kwas butanowy. Ta pochodna perylenu spowodowała zahamowanie jednej trzeciej antybakteryjnej aktywności daptomycyny” – str. 46, czy cały akapit rozpoczynający się od „Niedawne badania Ming-Tao Lee [114] nad *Bacillus subtilis* (...)” – str. 47. Podobny problem dotyczy opisu mechanizmu działania daptomycyny przedstawionego na rys. 12 (str. 49).
- 7) Na str. 59 Autorka używa pojęcia „stosunek molowy”, zamiast „ułamek molowy”.
- 8) Opis dynamicznego rozpraszania światła (str. 76) został nadmiernie uproszczony. Wielkością mierzoną są fluktuacje intensywności, a nie „natężenie światła”.

- 9) Podobnie nadmiernie zostało uproszczone wyjaśnienie wyboru wartości ciśnienia początkowego w zakresie 30-35 mN/m jako „ciśnienie jakie panuje w naturalnych układach biologicznych [275]”. Wyjaśnienie podane w pracy nie jest zgodne z tym opisanym przez D. Marsha w artykule, na który Autorka się powołuje.
- 10) W nielicznych fragmentach Autorka nie ustrzegła się stosowania żargonu, np. na str. 135-136 możemy przeczytać o „rejonie warstwy podwójnej” na wykresie zależności pojemności różniczkowej od przyłożonego potencjału.
- 11) Dlaczego na osi pionowej wykresów obrazujących zmiany ciśnienia powierzchniowego w czasie (dla monowarstw sprężonych początkowo do $\Pi=35$ mN/m) znajduje się $\Delta\Pi$ a nie Π ?

Waga wyżej opisanych drobnych (a w niektórych przypadkach - dyskusyjnych) niedociągnięć nie umniejsza jednak mojej ogólnej wysokiej oceny przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Otrzymane wyniki badań pozwoliły osiągnąć Autorce podstawowy cel rozprawy, tj. zbadanie oddziaływań wybranych lipopeptydów z modelowymi mono- i dwuwarstwami lipidowymi. Kandydatka pokazała, że umie formułować cele badawcze i planować eksperymenty w celu ich osiągnięcia. Mnogość wykorzystanych technik eksperymentalnych potwierdza, że mgr Dorota Konarzewska jest dojrzałym naukowcem i zasługuje na stopień naukowy doktora nauk chemicznych. Jej dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje trzy publikacje w bardzo wysoko cenionych czasopismach z dziedziny koloidów (*Langmuir* oraz *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, wg bazy Scopus, stan na dzień 12.09.2019).

Opiniowana praca doktorska przedstawia dużą wartość pod względem poznawczym i praktycznym, tym samym wnosi elementy nowości w dziedzinie nauk chemicznych. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Doroty Konarzewskiej zatytułowana " *Biomimetyczne filmy lipidowe i ich oddziaływania z lipopeptydami o właściwościach antybakteryjnych* " spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595). Wobec powyższego wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Doroty Konarzewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kamil Wojciechowski

