

Prof. dr hab. Tomasz Martyński  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej  
Instytut Badań Materiałowych i Inżynierii Kwantowej  
Politechniki Poznańskiej

Poznań, 23 września 2020 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej doktor Marii Janikowskiej-Sagan  
pod tytułem  
„Oddziaływanie digitoniny z cholesterolem błony komórkowej – badania fizykochemiczne i  
modelowanie teoretyczne ”  
wykonanej pod kierunkiem promotora: doktor habilitowanej Beaty Korchowicz, profesora  
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Rozumienie mechanizmów wpływu natywnych związków aktywnych biologicznie na lipidowe błony komórkowe jest niezwykle istotne z punktu widzenia ich roli w procesie terapii wielu chorób w tym wirusowych i nowotworowych. Funkcjonalność błony komórkowej w organizmach wynikająca z jej złożonego składu i organizacji co stanowi duże wyzwanie dla badaczy chcących poznać mechanizmy rządzące tym tak skomplikowanym systemem biochemicznym. To dzięki funkcjom błony lipidowej komórka może realizować wszystkie swoje procesy życiowe. Pomimo wielu subtelnych i wyrafinowanych technik pomiarowych, jakie dzisiaj są dostępne badaczom, niemożliwe jest rozwikłanie wszystkich aspektów organizacji składników błony i opisanie oddziaływań bez pomocy obliczeń kwantowo-mechanicznych z użyciem dużych mocy komputerowych. Wyniki symulacji komputerowych czyli tzw. eksperymentów *in silico* powiązane z doświadczeniami z zastosowaniem różnych techniki pomiarowych wspólnie dają głęboki wgląd w działanie złożonych układów biologicznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter klasycznej monograficznej pracy składającej się z 8 rozdziałów: wprowadzenia przedstawiającej cel i motywację podjęcia badań, części literaturowej, materiałów i metod, wyników pomiarowych z ich dyskusją, podsumowania badań w postaci najważniejszych wniosków, spisu literatury zawierającego 146 pozycji wspierającego dyskusję wyników, streszczenia i spisu osiągnięć

publikacyjnych i prezentacji wyników badań. Całość zawarta jest na 121 stronach z licznymi rysunkami.

Doktorantka jest studentką III stopnia kształcenia na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego a pracę doktorską wykonywała pod opieką naukową pani promotor dr hab. Beaty Korchowicz z Wydziału Chemii. Praca była realizowana również w Zakładzie Chemii Teoretycznej im. prof. Gumińskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Jacka Korchowca. Część pracy Doktorantka wykonywała podczas stażu naukowego w Belgii w Drag Research Institute, Université Catholique de Louvain pod kierownictwem prof. Marie-Paule Mingeot-Leclercq.

Celem pracy doktorskiej jaki sobie postawiła Doktorantka było zbadanie oddziaływania saponin z lipidami tworzącymi błonę biologiczną. Do tego celu wybrała digitoninę – saponinę steroidową, która ze środowiska wodnego adsorbowała do jedno-, dwu- lub trzyskładnikowych warstw lipidowych wytwarzanych dwoma technikami. Głównym zainteresowaniem było oddziaływanie digitoniny z innym steroidem – cholesterolem znajdującym się w warstwach molekularnych stanowiących modele błon biologicznych. Doktorantka zaplanowała badania oddziaływania tych molekuł i stwierdzenie czy dochodzi pomiędzy nimi do trwałych agregatów i aglomeratów w wyniku wiązań chemicznych. Powstawanie agregatów tego typu i ich rola w strukturze błony nie była dotychczasowo opisana w literaturze.

Wprowadzeniem do badań jest część literaturowa rozprawy, która w sposób przystępny przybliży czytelnikowi tematykę i techniki pomiarowe stosowane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Dużą część zajmują podstawowe informacje na temat modelowania *in silico*.

Z uwagi na złożony skład natywnych błon biologicznych Doktorantka badała warstwy lipidowe, składające się z dwóch lub trzech składników w równomolowych stężeniach (np. POPC+SM+cholesterol), formowane na subfazach zawierających saponinę. Dla weryfikacji uzyskanych wyników i ich interpretacji analizie poddawała warstwy na tworzone na wodzie oraz zastosowała referencyjne związki w tym saponinę występującą w korzeniach żeń-szeń – ginsenozyd Rh2 oraz diosgeninę, która zawierają szparagi.

Doktorantka stosowała dwie techniki do wytwarzania warstw lipidowych będących prostymi modelami błon biologicznych – technikę Langmuira oraz duże i gigantyczne liposomy. Stosując technikę Langmuira wytwarzała monowarstwy lipidowe na wodzie i na



wodzie zawierającą różne stężenia saponiny. Wytwarzane liposomy były w postaci pojedynczych dwuwarstw formowane z mieszaniny równomolowe fosfatydylocholiny (ePC) z jaj kurzych oraz sfingomieliny (SM). Tak przygotowywane obiekty badań były charakteryzowane z zastosowaniem wielu komplementarnych technik pomiarowych. Warstwy Langmuira charakteryzowano na podstawie przebiegów izoterm sprężania  $\Pi$ -A (zależności ciśnienia powierzchniowego  $\Pi$  względem średniej powierzchni przypadającej na molekułę A) oraz izoterm  $\Delta V$ -A (zmian potencjału powierzchniowego  $\Delta V$  względem A). Na tej podstawie określano fazę w jakiej znajduje się sprężana monowarstwa w zależności od jej składu oraz stężenia saponiny w subfazie. Przebiegi izoterm sprężania warstw lipidowych  $\Pi$ -A i  $\Delta V$ -A pozwalają ocenić tendencje orientacji molekuł w monowarstwie jednak najczęściej bez możliwości wyliczenia kątów jakie tworzą cząsteczki (długie osie cząsteczek) czy też ich fragmenty z normalną do monowarstwy. Tylko z pewną dokładnością można określić czy składniki monowarstwy tworzą homogeniczną mieszaninę dwuskładnikową czy też następuje separacja składników. Ten problem jest istotny z praktycznego punktu widzenia, gdyż w natywnych błonach komórkowych występują rafty, których skład różni się od sąsiadujących obszarów. Bardziej złożony model błony komórkowej stanowią liposomy. Doktorantka wytwarzała i charakteryzowała duże i gigantyczne dwuwarstwy liposomowe, zbudowane z tych samych lipidów co monowarstwy Langmuira, badając wpływ saponin na ich wielkość, stabilność i strukturę. Do charakteryzacji stosowała metody dynamicznego rozpraszania światła w celu określenia wielkości wytwarzanych lipidów i dystrybucji rozmiarów a z zastosowaniem sond fluorescencyjnych rejestrowała obrazy struktur liposomów. Z pomiarów spolaryzowanych składowych widm fluorescencji sond umieszczanych w dwuwarstwach lipidowych liposomów Doktorantka wylicza parametry porządku charakteryzujące stopień organizacji lipidów. Tego typu pomiary są bardzo trudne a na uzyskany wynik wpływa wiele czynników takich jak rozproszenie światła, reabsorpcja, wtórna emisja itp. W pracy jednak nie ma schematu aparatury do pomiaru anizotropii emisji i choćby skromnego opisu zastosowanej techniki pomiarowej.

Znaczącą część rozprawy stanowią obliczenia numeryczne, wnoszącą dużo istotnych informacji przyczyniających się do zrozumienia oddziaływań i organizacji składników warstw lipidowych oraz wpływu na nie saponin. Doktorantka zastosowała metody dynamiki molekularnej i chemii kwantowej do określenia procesu adsorpcji i/ oraz penetracji warstw lipidowych przez saponiny. Metody *in silico* pozwoliły także na szczegółową analizę

oddziaływań międzymolekularnych i zbadania warunków tworzenia się aglomeratów digitoniny z cholesterolem. Uzyskane wyniki i ich dyskusja stanowią bardzo znaczącą część rozprawy.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział 4. zajmujący połowę pracy. Jak na wstępie pisze Doktorantka, oddziaływanie digitoniny z cholesterolem jest często obiektem badań lecz pełen mechanizm nie został jeszcze dobrze poznany. Niniejsza praca stanowi znaczny postęp w zrozumieniu ich relacji. Plan badań zostały dobrze przemyślane i logicznie zaplanowane. Materiał badawczy jest bardzo obszerny a liczba wykonanych eksperymentów bardzo duża.

Eksperymenty wykonywane były według podobnego schematu co umożliwiło Doktorantce porównywanie właściwości badanych układów oraz precyzyjną analizę wpływu adsorbowanych saponin do coraz to bardziej złożonych warstw lipidowych. Dotyczy to eksperymentów wykonywanych za pomocą techniki Langmuira jak i wytwarzania i analizie jednowarstwowych dużych i gigantycznych liposomów. Podobnie przyjęto schemat postępowania w eksperymentach *in silico* analizując dynamikę molekularną molekuł saponin adsorbujących z subfazy wodnej do monowarstw lipidów dla kilku ciśnień powierzchniowych. Obliczenia przeprowadzono w warunkach stałej liczby cząsteczek, stałej temperatury i ciśnienia oraz stałego napięcia powierzchniowego lub stałej powierzchni zajmowanych przez monowarstwy. Dla badanych układów obliczono kąty ułożenia długich osi molekuł, wyliczono parametr porządku oraz możliwości oddziaływania odpowiednich par atomów w sąsiadujących cząsteczkach saponin i lipidów.

Pierwsze eksperymenty wykonano dla jednoskładnikowych monowarstw Langmuira cholesterolu i diosgeniny sprężanych na subfazie złożonej z czystej wody i wody z zawartością digitoniny. Zaskakującym wnioskiem wynikającym z badań jest stwierdzenie, że podczas sprężania warstwy cholesterolu na subfazie zawierającej większe stężenie digitoniny następuje rozluźnienie monowarstwy Langmuira. Doktorantka nie przeprowadziła głębszej dyskusji przyczyn zmniejszenia współczynnika ściśliwości warstwy lipidowej na poziomie molekularnym. Minima w przebiegu współczynnika ściśliwości w funkcji ciśnienia powierzchniowego świadczą przejściach fazowych do kolejnych najczęściej lepiej zorganizowanych struktur. W przypadku badania oddziaływania digitoniny z jednoskładnikową warstwą diosgeniny Doktorantka stwierdza, że występuje silne oddziaływanie między cząsteczkami co prowadzi do zmniejszenia uporządkowania podczas



sprężana dla wyższych ciśnień powierzchniowych. Na czym polega destabilizacja struktur warstw lipidowych? Czy przy wyższych ciśnieniach powierzchniowych warstwy Langmuira sprężanej na subfazie z dużym stężeniem digitoniny warstwy są homogeniczne i czy nie powstają w tych warunkach struktury 3D? Ten problem dotyczy również pozostałych eksperymentów z warstwami Langmuira, zwłaszcza tych gdy warstwę tworzą dwa lub trzy lipidy. W takich przypadkach pojawia się ważne pytanie dotyczące mieszalności składników lipidowych. Mieszalność może być inna w przypadku warstw tworzonych na subfazie z czystej wody i z zawartością saponin.

O złożoności oddziaływania digitoniny na monowarstwę cholesterolu i diosgeniny wskazują eksperymenty z monowarstwami Langmuira tworzonymi na subfazach o najwyższym stężeniu digitoniny (65  $\mu\text{M}$ ). Brak powtarzalności przebiegu izoterm sprężania świadczy o silnych procesach adsorpcji i związanych z tym zmian organizacji warstw molekularnych. Uzyskanie powtarzalności rejestrowanych izoterm po dwukrotnym sprężaniu i rozprężaniu wskazuje na separację składników i prawdopodobnie powstawanie aglomeratów w postaci większych trójwymiarowych obiektów. Prawdopodobnie obserwacje tekstur tych monowarstw za pomocą mikroskopu Brewstera rzuciłyby więcej światła na powstający układ.

Modelowanie komputerowe za pomocą dynamiki molekularnej zachowania się cząsteczek saponin w kontakcie z jedno- i wieloskładnikową monowarstwą lipidową pozwala na głębszy wgląd w mechanizmy rządzące adsorpcją. Wzajemne ułożenie molekuł w monowarstwach w obecności saponin w bardzo dobitny sposób pokazują rysunki rzutów z góry i w przekroju poprzecznym do powierzchni monowarstwy. Na podstawie wybranych stanów, w odpowiednim oknie czasowym, zobrazowane zostały położenia cząsteczek digitoniny. Pomimo małej liczby (8) cząsteczek digitoniny widoczne są niejednorodności rozkładu adsorbentu. Doktorantka prezentuje profile gęstości monowarstw dla poszczególnych części cząsteczek wskazujące na ich położenie względem powierzchni wody. Położenie cząsteczek digitoniny w sposób ogólny wskazuje dystrybucja środków masy tych cząsteczek. Analiza radialnych funkcji rozkładu dostarczyła informacji na temat stopnia uwodnienia monowarstw lipidowych. Wpływ zaadsorbowanej saponiny na organizację monowarstwy Doktorantka określa również za pomocą rozkładu kąta jaki tworzy wektor długiej osi molekuł cholesterolu z normalną do warstwy lipidowej.

Podobny schemat eksperymentów *in silico* Doktorantka przyjęła w pozostałych

analizowanych układach molekularnych. Wraz ze wzrostem liczby składników tworzących monowarstwę wyniki doświadczeń ze sprężaniem warstw Langmuira stają się coraz trudniejsze do analizy tylko na podstawie rejestrowanych izoterm. Sytuację rozjaśniają wyniki symulacji komputerowych. W niektórych przypadkach wydaje się, że dyskusja uzyskanych wyników obliczeniowych idzie za daleko. Przykładem może być rozkład kątów nachylenia długich osi lipidów prezentowany na rysunku 4.32 gdzie Doktorantka zauważa kilka maksimów na krzywej przypadających dla zbliżonych wartości kąta. Wydaje się, że dla rozważanych około 100 cząsteczek lipidu w wieloskładnikowej warstwie nie daje dostatecznie dużego zespołu statystycznego dla wyciągania tak szczegółowych wniosków.

Bardzo cenne są obliczenia kwantowo-mechaniczne sił wiążących dwie z najważniejszych w tej rozprawie doktorskiej molekule – cholesterol i digitoninę, które prawdopodobnie tworzą aglomeraty. Obliczone wielkości sił wskazują na istnienie oddziaływań van der Waalsa. Dla porównania Doktorantka wykonała również obliczenia dla par diosgenina-digitonina. Otwartym ciągle problemem pozostaje to czy tworzą się tylko pary cholesterol-digitonina czy równie prawdopodobne jest powstawanie większych aglomeratów.

Niedosyt budzi brak analizy izoterm zmian potencjału powierzchniowego  $\Delta V$  względem średniej powierzchni przypadającej na molekułę. Doktorantka zamieszcza te izotermy wspólnie z izotermami II-A ale nie szuka korelacji pomiędzy nimi. Zmiany wartości  $\Delta V$  świadczą o uporządkowaniu molekuł na powierzchni granicy faz. Szkoda, że Doktorantka nie pokusiła się o korelacje tych danych z eksperymentami *in silico*. Pewnym usprawiedliwieniem jest fakt stopnia złożoności badanych warstw molekularnych.

Wartościową i interesującą z punktu poznawczego częścią rozprawy są rozdziały opisujące wyniki eksperymentów z dużymi i gigantycznymi liposomami. Doktorantka musiała poznać preparatykę liposomów oraz nowoczesne metody ich charakteryzacji. Pomierzyła średnice liposomów metodą dynamicznego rozpraszania światła a poprzez zastosowanie kilku sond fluorescencyjnych lokujących się w różnych obszarach warstw lipidowych mogła obrazować zmiany struktur badanych układów. Dwuwarstwę lipidową, które tworzą liposomy są bliższym modelem błony biologicznej niż monowarstwę Langmuira. Ciekawym wynikiem uzyskanym przez Doktorantkę są zdjęcia mikroskopowe, które wskazują na występowanie separacji składników w liposomach. Ten fakt rzuca pewne światło na możliwość występowania separacji faz w niektórych z badanych warstw Langmuira. Zdjęcia



mikroskopowe uwidocznily też proces pączkowania liposomów w zależności od składu dwuwarstwy i stężenia saponin.

Rozprawę kończy rozdział 5. Wnioski, w którym Doktorantka zebrała syntetycznie w punktach najważniejsze dokonania poszerzające wiedzę na temat oddziaływań saponin z mono- i dwuwarstwami lipidowymi jako modelami błon komórkowych.

Całość rozprawy pani mgr Marii Janikowskiej-Sagan należy ocenić bardzo wysoko nie tylko z powodu ilości wykonanych eksperymentów ale zwłaszcza z powiązania ich z eksperymentami *in silico*. Szeroki zakres i różnorodność obliczeń komputerowych wymagała dużego zaangażowania a przede wszystkim zagłębienia się, i poznania wielu złożonych technik symulacji komputerowych. Technika wytwarzania warstw Langmuira oraz preparatyka prowadząca do uzyskania dużych stabilnych liposomów i prawidłowa interpretacja wyników wskazuje na to, że Doktorantka osiągnęła wysoki poziom wiedzy i umiejętności. Wyniki pracy Doktorantki zostały opublikowane (4 publikacje) w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR) o wysokim parametrze wpływu IF. Były również prezentowane na kilku konferencjach krajowych i zagranicznych w formie plakatowej.

Pewne niedoskonałości w redakcji rozprawy doktorskiej mają wpływ na wysoką ocenę dokonań naukowych. W pracy jest dość dużo nieprecyzyjnych określeń i języka żargonu laboratoryjnego. Dwa rozdziały mają praktycznie ten sam tytuł (4.2.2 Modelowanie MD –Oddziaływanie monowarstwy cholesterolu z digitoniną – str. 55 i Modelowanie MD – układ cholesterol – digitonina – str. 69). Podpisy pod rysunkami często są zbyt lapidarne co wymaga szukania szczegółów w tekście.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Marii Janikowskiej-Sagan stanowi znaczące osiągnięcie Doktorantki poszerzające wiedzę o oddziaływaniach pomiędzy badanymi molekułami tworzącymi błony biologiczne. Doktorantka udowodniła, że potrafi prowadzić badania naukowe na wysokim poziomie. W moim przekonaniu, przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Marii Janikowskiej-Sagan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Tomasz Masturko