



Dr hab. Paweł Weroński

Kraków, 21.09.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Marii Janikowskiej-Sagan

**„Oddziaływanie digitoniny z cholesterolem błony komórkowej -
badania fizykochemiczne i modelowanie teoretyczne”**

Intensywny rozwój nauk medycznych stymuluje ciągle poszukiwania nowych leków o nieznanym dotychczas mechanizmach działania i związanej z nimi budowie molekularnej. Jest to spowodowane, z jednej strony, rosnącą różnorodnością chorób i zaburzeń funkcjonowania organizmu ludzkiego, na które medycyna próbuje coraz lepiej odpowiadać. Z drugiej strony, potrzeba poszukiwania nowych terapeutyków i substancji bioaktywnych wynika ze znanego zjawiska nabywania wielolekooporności przez kliniczne szczepy bakterii. Szczególną grupę struktur chemicznych o dużej aktywności biologicznej stanowią liczne związki pochodzenia naturalnego, wśród nich saponiny. Są to amfifilowe glikozydy, naturalnie występujące w bakteriach, niektórych organizmach morskich, a szczególnie w roślinach. Aktywność tych związków wynika bezpośrednio z ich amfifilowej budowy molekularnej, która umożliwia im różnorodne oddziaływanie z dwuwarstwami lipidowymi komórek. Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska prezentuje badania fizykochemiczne, których celem był opis oddziaływania dwóch saponin steroidowych, digitoniny (Dig) i ginsenozydu Rh2 (Rh2), z modelowymi mono- i dwuwarstwami lipidowymi. Ze względu na potencjalne praktyczne wykorzystanie wyników tych badań temat rozprawy jest interesujący i ważny nie tylko poznawczo, ale również aplikacyjnie.

Rozprawa liczy ok. 120 stron, przy czym jej zasadnicza część składa się z pięciu rozdziałów. Rozdział pierwszy obejmuje krótkie wprowadzenie i sformułowanie celu pracy. Cel ten był trojaki. Po pierwsze, było nim poznanie mechanizmu oddziaływania Dig z dwoma sterolami, mianowicie z cholesterolem (Chol) i diosgeniną (Dios), która również jest steroidową saponiną. Użycie Dios miało na celu określenie roli łańcucha alifatycznego Chol w oddziaływaniach z Dig. Drugim celem było eksperymentalne zbadanie wpływu Dig i Rh2 na modelowe błony biologiczne, które stanowiły jednowarstwowe liposomy utworzone z równomolowych mieszanin

ul. Niezapominajek 8, 30-239 Kraków, Polska

tel. +48 12 639 51 01, +48 12 425 19 23

fax +48 12 425 19 23

Nr konta: Bank Gospodarstwa Krajowego

PL 36 1130 1150 0012 1186 5820 0004

NIP: 6750001805, REGON: P-000326351

fosfatydylocholiny (ePC) i sfingomieliny (SM), z dodatkiem lub bez dodatku Chol. Ostatnim celem badań był opis oddziaływania Dig z monowarstwami lipidowymi o składzie bardziej przypominającym błony komórkowe, utworzonymi z równomolowej mieszaniny POPC i SM, z dodatkiem lub bez dodatku Chol.

Rozdział drugi, o tytule „Część literaturowa” i objętości 37 stron, zawiera najważniejsze informacje wprowadzające w problematykę rozprawy i przydatne do lepszego zrozumienia metod badawczych stosowanych przez Autorkę. W rozdziale tym przedstawiony jest opis błony komórkowej, czterech rodzajów lipidów, trzech saponin, modelowych mono- i dwuwarstw lipidowych, a także kilku metod wykorzystanych w badaniach. Są to metody pomiaru ciśnienia i potencjału powierzchniowego monowarstwy, dynamiczne rozpraszanie światła, spektroskopia fluorescencyjna, a także trzy metody obliczeniowe: teorii funkcjonału gęstości, teorii atomów w cząsteczkach oraz dynamiki molekularnej (MD). Jak można wywnioskować z tego zestawienia, Autorka zastosowała w swoich badaniach różnorodne metody, zarówno teoretyczne jak i eksperymentalne, co bardzo dobrze świadczy o jej warsztacie naukowym.

Niestety w równaniach pojawiających się w tej części rozprawy znajduje się szereg błędów i nieścisłości. Poniżej pozwoliłem sobie wymienić najważniejsze z nich.

1. W równaniu 2.6 zmienna θ nie została zdefiniowana.
2. W równaniach 2.6 oraz 2.7 przyrównane są wielkości wektorowe i skalarne.
3. W równaniu 2.15 m.in. pominięta została przenikalność elektryczna.
4. W równaniu 2.20 podany jest błędny współczynnik „ 4π ” zamiast „ 2π ”.
5. W równaniu 2.27 „ Z_a ” nie oznacza liczby atomowej, lecz ładunek jądra atomowego.
6. W równaniu 2.31 występuje nieopisana wielkość „ $E(B^0)$ ”, która prawdopodobnie miała oznaczać „ $E(B^0)_b$ ”.
7. W równaniu 2.32 „ $\nabla\rho(\mathbf{r})$ ”, gdzie $\rho(\mathbf{r})$ jest gęstością elektronową, nie jest „powierzchnią”.
8. W równaniu 2.33 brak składnika opisującego odpychanie Borna, ponieważ wbrew opisowi w punkcie 4 na stronie 29 oddziaływania van der Waalsa nie „zapobiegają przed zbliżeniem się atomów na odległość mniejszą niż suma ich promieni van der Waalsa”.
9. Równanie 2.38 powstaje przez sumowanie, a nie odejmowanie, równań 2.36 i 2.37.

10. W równaniu 2.39 czynnik $\frac{1}{2}$ został zamieniony na znak „-”.

W rozdziale drugim występują ponadto stosunkowo liczne, drobniejsze nadużycia. Np. w równaniach 2.7 i 2.8 niepotrzebnie użyte są nawiasy kwadratowe. Pole siłowe nie opisuje energii potencjalnej w przestrzeni $3N-6$ -wymiarowej, lecz w przestrzeni $3N$ -wymiarowej. Radialna funkcja gęstości mierzy liczbę molekuł w cienkiej powłoce sferycznej o grubości Δr , a nie „w pierścieniach o przekroju Δr ”. Nie brak niezbyt szczęśliwych zwrotów czy trudnych do zrozumienia zdań, np. zamiast wyrazu „speckle”, który dotychczas nie przyjął się chyba formalnie w języku polskim, poprawniej byłoby użyć „plamki”. Razi też zamienne użycie wyrazów „hesjan” i „Hessjan” dla wyrażenia tego samego pojęcia. „Równowagowanie” nie jest chyba poprawnym słowem w j. polskim, należałoby użyć „równoważenie”. Zamiast „gradient obliczony z energii wynosi 'zero'” poprawniej byłoby, jak sądzę, użyć sformułowania „gradient energii jest równy zeru”. Brak możliwości przeprowadzenia reakcji chemicznej nie jest wadą pól siłowych, lecz raczej mankamentem samej metody klasycznej MD. Stała Boltzmanna jest oznaczona na str. 1 jako „ k_b ”, natomiast na dalszych stronach jako „ k_B ”. Niekonsekwentne jest też użycie notacji wektorowej. W większości równań zawierających wektory są one oznaczone tłustą czcionką, ale np. w równaniu 2.32 i w tekście poniżej tego równania są one oznaczone strzałką.

Rozdział trzeci rozprawy, pt. „Materiał badawczy i metody”, prezentuje szczegóły stosowanych materiałów i metod eksperymentalnych. Generalnie opisy zawarte w tej części rozprawy są napisane klarownie i wyczerpująco. W sekcji 3.1 moją uwagę zwróciła jednak bardzo niska czystość Dig (66%). Jakie były pozostałe składniki tego preparatu i czy ich obecność mogła wpłynąć na uzyskane wyniki eksperymentalne? Czy nie było potrzeby, czy też możliwości uzyskania Dig o wyższej czystości, nawet w ramach własnego laboratorium? W drugiej części rozdziału Autorka podała najważniejsze informacje potrzebne do odtworzenia obliczeń kwantowo-chemicznych oraz symulacji MD. Dwa szczegóły budzą w tym zakresie mój niepokój. Pierwszy dotyczy modelu TIP3P molekuły wody użytego w symulacjach MD. Jak Doktorantka podaje na str. 33, model ten nie odtwarza poprawnie ani radialnej funkcji rozkładu, ani napięcia powierzchniowego wody. Dlaczego więc wybrano ten właśnie model wody, skoro przedmiotem badań była radialna funkcja rozkładu i adsorpcja z roztworów wodnych, zależna od napięcia powierzchniowego na granicy międzyfazowej? Druga kwestia dotyczy równoważenia układów symulowanych metodą MD. W rozdziale trzecim, podobnie jak w pozostałej części rozprawy, nie znalazłem żadnej informacji o stosowaniu jednoznacznego kryterium, które pozwalało na wybór odpowiedniego czasu równoważenia badanych układów. Czy takie kryterium było stosowane, jeśli tak to jakie?

W rozdziale czwartym, niezbyt trafnie zatytułowanym „Wyniki pomiarów”, Autorka zamieściła wyniki eksperymentalne i teoretyczne swoich badań. Rozdział ten ma 56 stron i stanowi najważniejszą część rozprawy. Adekwatnie do celu badań opisanego w rozdziale pierwszym, można tutaj wyróżnić trzy zasadnicze części. Część pierwsza (sekcje 4.2 i 4.3) prezentuje wyniki badań oddziaływania Dig z monowarstwami Chol i Dios. W części drugiej (sekcje 4.4 i 4.5) zawarte zostały wyniki badań nad wpływem Dig i Rh2 na dwuwarstwy lipidowe ePC + SM oraz ePC + SM + Chol. Natomiast część trzecia (sekcja 4.6) obejmuje wyniki badań oddziaływania Dig z monowarstwami lipidowymi POPC + SM oraz POPC + SM + Chol.

Opis badań zawarty w tym rozdziale jest skondensowany i zawiera wiele ciekawych wyników oraz, na ogół trafną, ich interpretację. Nie kwestionując ogólnej wartości tych rozważań wydaje mi się jednak, że niektóre wnioski nie są wystarczająco dobrze uzasadnione i mogą być nieuprawnione. Mam tu na myśli przede wszystkim część wniosków opartych na wynikach symulacji MD. Jak wiadomo, w celu otrzymania wiarygodnych informacji numerycznych konieczne jest odpowiednie wstępne zrównoważenie symulowanego układu. W przeciwnym razie może się okazać, że otrzymane wyniki odnoszą się do pewnego stanu przejściowego, który znacząco różni się od układu eksperymentalnego. W sekcji 4.2.2 Autorka podaje, że po złożeniu układów były one równoważone przez 35 ns przy stosunkowo dużej, stałej powierzchni cząsteczkowej 0.55 nm^2 . Następnie układy te były kompresowane do stałych ciśnień powierzchniowych 15, 25 lub 35 mN/m. Czy tak przygotowane układy można uznać za zrównoważone?

W rozprawie brak informacji nt. czasu trwania tej kompresji, ale z oczywistych względów musiała ona trwać stosunkowo krótko, być może 100 ns. Doktorantka nie podaje także wielkości zmian powierzchni, które towarzyszyły kompresowaniu układów. Uwzględniając stężenie Dig w symulacjach (ok. 10 mM) można jednak oszacować, na podstawie wyników eksperymentalnych na rys. 4.2A i 4.2C, że względne zmiany powierzchni były rzędu 0.1. Dzieląc wielkość względnych zmian powierzchni przez czas ich wytworzenia dostajemy astronomicznie dużą prędkość kompresji rzędu 10^6 Hz . W celu właściwej oceny tej wielkości pozwolę sobie porównać ją z wartością stosowaną w eksperymentach. Jak podaje Autorka w sekcji 3.2.1, maksymalna prędkość kompresji monowarstwy wynosiła 5 mm/min., co przy długości warstwy rzędu 10 cm daje prędkość kompresji rzędu 10^{-3} Hz . Tak więc prędkość kompresji w symulacjach jest o dziewięć rzędów wielkości większa niż w eksperymencie. Wydaje się wobec tego oczywistym, że po kompresji symulowane układy były dalekie od równowagi. Czy mogły ją uzyskać po kolejnych 50 ns wstępnej symulacji?

W celu odpowiedzi na to pytanie warto porównać czasy równoważenia warstw o stałej powierzchni. Doktorantka podaje w sekcji 4.3.2 czas równoważenia przed symulacją równy 50 ns, natomiast w sekcji 3.2.1 czas równoważenia przed pomiarem 10 min. Czas równoważenia monowarstwy w symulacjach był więc o dziesięć rzędów wielkości krótszy niż w eksperymencie. Wydaje mi się więc mało prawdopodobnym, aby układy symulowane przy stałej powierzchni były zrównoważone. Co więcej, jak podaje Autorka na stronach 52-53, pomiary prowadzone dla stężenia Dig 65 μM dawały powtarzalne wyniki dopiero po uprzednim wykonaniu dwóch cykli kompresji-dekompresji monowarstwy. Sugeruje to, że przy stężeniach Dig większych niż 0.1 mM czas dochodzenia układu do równowagi może być wielokrotnie dłuższy niż 10 min. W świetle tych oszacowań wydaje mi się więc również mało prawdopodobnym, aby układy symulowane przy stałym ciśnieniu były zrównoważone.

Nie chciałbym, aby moje uwagi w tym zakresie zostały potraktowane jako ostateczna, autorytatywna ocena wykonanych symulacji, lecz raczej jako rodzaj wskazówki metodologicznej do dalszych badań. Autorka nie podaje, jak zaznaczyłem już wcześniej, czy i jakie kryterium zastosowała do oceny zrównoważenia swoich układów. Cieszyłbym się, gdyby powyższe oszacowania pomogły jej docenić znaczenie stosowania odpowiedniego kryterium tego typu w przyszłych symulacjach. Może warto też zastosować bardziej zaawansowane metody równoważenia układów, np. wymianę replik. W każdym razie wnioski wyciągane w pracy na temat adsorpcji Dig i Rh2 przy monowarstwach, w szczególności dotyczące penetracji hydrofobowych części tych saponin w głąb monowarstwy, wydają mi się niewystarczająco uzasadnione.

Do niewdzięcznej roli recenzenta należy niestety wytknięcie rozmaitych mankamentów ocenianej pracy, dlatego jestem zmuszony wymienić również szereg innych, stosunkowo nieistotnych braków i nieścisłości zauważonych w rozdziale czwartym.

1. Krzywe przedstawione na rys. 4.2A i 4.2B dla stężenia Dig 6.5 μM nie wydają się sobie odpowiadać – maksimum krzywej na rys. 4.2B powinno wystąpić przy ciśnieniu ok. 20 mN/m, a nie ok. 35 mN/m.
2. Wartości ciśnienia i powierzchni w punkcie załamania dla monowarstwy Chol i stężenia Dig 0.65 μM podane w tekście i Tab. 4.1 nie odpowiadają wartościom podanym na wykresie 4.2A (krzywa czerwona).
3. Wartości ciśnienia w punktach załamania dla monowarstwy Dios i stężeń Dig 0 oraz 0.65 μM podane w tekście i Tab. 4.1 nie są zgodne z tymi na wykresach 4.2C (krzywe czarna i czerwona).

4. W dyskusjach nt. rozkładu kąta nachylenia molekuł kilkakrotnie pojawia się określenie „średnio”, „większość cząstek”, czy „cząstki” w odniesieniu do maksimum tego rozkładu, chociaż w kilku przypadkach użyto poprawnego określenia „najczęściej”.
5. Badania przy stałej powierzchni przeprowadzono dla powierzchni 0.45 nm^2 / molekułę, przy czym Autorka podaje, że wówczas monowarstwy Chol i Dios znajdują się w fazie ciekłej skondensowanej ($100 < C_s^{-1} < 250$). Jednak z wykresów na rys. 4.2 wynika, że przy tej powierzchni ciśnienie jest rzędu 1 mN/m , co odpowiada wartości $C_s^{-1} < 100$.
6. Sądząc z rozrzutu punktów (zaledwie siedmiu) na wykresie 4.13D wydaje mi się mało prawdopodobnym, aby ciśnienie wysycenia monowarstwy, wyznaczone przez ekstrapolację tego wykresu, można było określić z dokładnością trzech cyfr znaczących, jak podano w ostatnim paragrafie sekcji 4.3.1.
7. Kolory czerwony i czarny na wykresach rys. 4.19A wydają się zamienione ze sobą. Podobnie na rys. 4.22A w przypadku monowarstw Chol.
8. Brak opisu oznaczenia „***” na rys. 4.23.
9. Brak opisu osi poziomej „DIG [μM]” oraz „Rh2 [μM]” na rys. 4.24.
10. Brak opisu kolorów krzywych na rys. 4.28.
11. Podane w sekcji 4.6.1 wartości ciśnienia i powierzchni odpowiadające załamaniu monowarstw nie odpowiadają wykresom na rys. 4.28. Podobnie maksymalna wartość współczynnika C_s^{-1} dla układu z Dig (krzywa czerwona).
12. Występują rozbieżności między wartościami asymptotycznymi ciśnień podanymi w tekście i na rys. 4.29.
13. Brak opisu koloru krzywych na rys. 4.35.
14. Niezgodność powierzchni cząsteczkowej i maksymalnych wartości współczynnika C_s^{-1} w tekście sekcji 4.6.2 oraz na rys. 4.35.
15. Brak opisu koloru krzywych na rys. 4.42.

Jak jednak wspominałem powyżej, uważam te niedoskonałości za mało znaczące, ponieważ mają one charakter pomyłek. Szkoda, że są one stosunkowo liczne, bo przez to rozprawa znacznie traci na czytelności i jest trudniejsza do praktycznego wykorzystania.

Ostatni, piąty rozdział zasadniczej części rozprawy zawiera dwanaście wniosków oraz bibliografię w liczbie 148 publikacji. Niektóre ze stwierdzeń we wnioskach wydają się dość oczywiste i trudno z nimi polemizować. Do takich należy penetracja hydrofobowej części Dig do wnętrza monowarstwy lipidowej, odnotowana we wniosku drugim. Są też takie wnioski, które wydają się sprzeczne z intuicją i moim zdaniem, jak starałem się uzasadnić powyżej, powinny zostać poddane dalszej weryfikacji. Wymieniłbym tutaj przede wszystkim stwierdzenie zawarte we wniosku dziewiątym, że część aglikonowa Dig nie penetruje do wnętrza monowarstw POPC + SM. Ze względu na stosunkowo duże momenty dipolowe hydrofilowych głów tych surfaktantów penetracja hydrofobowej części Dig do wnętrza takiej monowarstwy wiąże się z pokonaniem stosunkowo wysokiej bariery energetycznej. Dlatego symulacje takiego układu mogą wymagać szczególnie długiego czasu lub raczej zastosowania technik bardziej zaawansowanych niż klasyczna MD. Niewątpliwie jednak wiele spośród otrzymanych wyników i przeprowadzonych analiz pogłębia znacząco naszą wiedzę nt. oddziaływania Dig i Rh2 z warstwami lipidowymi. Mogą one okazać się szczególnie przydatne w badaniach biologicznych z wykorzystaniem saponin, zwłaszcza w odniesieniu do błon komórkowych.

Podsumowując uważam, że Autorka zgromadziła i opracowała interesujący materiał o dużym znaczeniu poznawczym, co pozwoliło jej w znacznym stopniu zrealizować założony cel badań. Rozprawa zawiera elementy nowości naukowej, o czym świadczy fakt opublikowania otrzymanych wyników w dwóch renomowanych czasopismach naukowych. Jednym z ważniejszych osiągnięć jest próba zastosowania metod chemii kwantowej i klasycznej MD do ilościowego opisu oddziaływania między molekułami Chol i Dig. Warto zauważyć, że oprócz publikacji związanych z rozprawą Doktorantka jest współautorką dwóch innych artykułów w czasopismach o wysokim współczynniku IF, a także współautorką sześciu wystąpień konferencyjnych. Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne nie wpływają na ogólną dobrą ocenę pracy doktorskiej p. Marii Janikowskiej-Sagan. Stwierdzam, że dysertacja spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim w odnośnej Ustawie. Wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do stopnia doktora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

