

prof. dr hab. Alina Dudkowiak
Zakład Fizyki Molekularnej
Instytut Fizyki
Wydział Fizyki Technicznej
Politechnika Poznańska

Poznań, 31 lipca 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr. Joanny Sagan

pt. ***“Badanie samoorganizacji antybiotyku polienowego amfoterycyny B metodami spektroskopii molekularnej”***

Rozwój technik medycznych i terapeutycznych stawia przed współczesną medycyną coraz to nowe wyzwania. Zakażenia grzybicze stanowią istotne powikłania w przypadku nabytej lub indukowanej obniżonej odporności organizmu np. w wyniku chemioterapii czy zabiegów transplantacyjnych. Amfoterycyna B (AmB), należąca do grupy antybiotyków polienowych stosowanych do leczenia grzybic, pomimo zaliczania jej do leków ratujących życie, wykazuje zarówno zadowalającą aktywność farmakologiczną, jak i silne efekty uboczne. Istotne, dla aktualnie prowadzonych badań dotyczących poszukiwania lub modyfikowania istniejących form leków, wydaje się wyjaśnienie mechanizmu działania AmB na poziomie molekularnym.

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Joanny Sagan było określenie form agregacyjnych tworzonych przez AmB oraz znalezienie parametrów umożliwiających ich identyfikację zarówno w środowisku wodnym oraz po wbudowaniu w warstwy lipidowe (w tym zawierające sterole). Badania ukierunkowane były na zweryfikowanie hipotezy dotyczącej tworzenia kanałów jonowych lub struktur gąbczastych przez różne formy organizacyjne AmB oraz stosowania białka jako nośnika leku. Badania prowadzono w różnych układach modelowych, tj. rozpuszczalnikach organicznych, roztworach wodnych oraz liposomach (małych (SUV) i gigantycznych (GUV) liposomach jednowarstwowych oraz wielowarstwowych (MLV)).

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Wiesława Gruszeckiego oraz dr. Krzysztofa Tutaja jako promotora pomocniczego, w Zakładzie Biofizyki Instytutu Fizyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, renomowanym w kraju i za granicą ośrodkiem badań biofizycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma 124 strony, na których umieszczono 52 rysunki, prezentujące schematy, wyniki pomiarów i ich analizę oraz 7 tabel. Układ pracy jest typowy,

z zachowaniem odpowiednich proporcji pomiędzy częścią teoretyczną i doświadczalną. Cytowane piśmiennictwo w rozprawie liczy 178 pozycji, w tym najnowsza z maja 2016 roku, co wskazuje na bieżące śledzenie dostępnej literatury związanej z tematyką rozprawy.

Rozdział pierwszy (*Przegląd literatury*) zredagowano na podstawie ok. 150 pozycji literaturowych, w tym klasycznych opracowań Davydova (1964), Kashy (1963, 1965) i Scheibe (1936). Ten imponujący przegląd piśmiennictwa świadczy o bardzo rzetelnym i wszechstronnym przygotowaniu pani mgr Joanny Sagan w zakresie tematyki badań. W rozdziale tym opisano infekcje grzybicze i stosowane leki oraz zebrano niezbędne informacje z zakresu podstaw spektroskopii fluorescencyjnej i oddziaływań pomiędzy molekułami tworzącymi struktury zagregowane. Ponadto, przeanalizowano dotychczas przeprowadzone badania, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości fizykochemicznych i spektroskopowych AmB oraz proponowanych modeli dotyczących mechanizmu działania leku i jego selektywności, związanej z różnym powinowactwem do steroli występujących w błonach komórkowych. Autorka, omawiając właściwości spektroskopowe AmB, prezentuje widma absorpcji, emisji fluorescencji (rys. 1.7, 1.8) oraz kołowego dichroizmu (1.9) w DMSO i roztworach wodnych, które później znajdujemy również w części doświadczalnej (rozdział 6). Zwyczajowo, w tego typu opracowaniu we wstępie literaturowym, przedstawia się raczej wyniki i teorie dotychczas opublikowane przez innych autorów.

Kolejne rozdziały zawierają sformułowaną przez Autorkę hipotezę badawczą i cel pracy (rozdziały 2 i 3). Trochę niepotrzebne wydaje się różnicowanie celów i wprowadzenie następujących zwrotów „Głównym celem pracy była weryfikacja centralnej hipotezy....”, a dalej „Ponadto, przyjęto cele poboczne, umożliwiające osiągnięcie celu zasadniczego....”.

Rozdział czwarty *Materialy i metody* umożliwia zapoznanie się ze stosowanymi w pracy metodami badawczymi oraz istotnymi warunkami eksperymentalnymi. Na uznanie zasługuje dobór odpowiednich metod wykorzystanych do charakteryzacji badanych próbek. Do badań zastosowano zarówno techniki standardowe (spektroskopię absorpcyjną (również w świetle kołowo spolaryzowanym) i emisyjną) oraz zaawansowane (spektroskopię anihilacji czasów życia pozytonu (PALS), czasowo rozdzielczą spektroskopię czasów życia fluorescencji, mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) oraz spektroskopię korelacji fluorescencji (FCS) i obrazowania anizotropii fluorescencji).

W następnym rozdziale *Preparatyka próbek* (rozdział 5) znajdujemy opis metody oczyszczania komercyjnie dostępnej AmB z wykorzystaniem m.in. wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz procesu formowania liposomów i wprowadzania leku. Ponadto, podano uzasadnienie wyboru odpowiednich układów modelowych wykorzystanych

do weryfikacji założonych hipotez dotyczących łączenia i transportu leku przez białko oraz sprawdzenia aktywności przeciwgrzybiczej komercyjnego preparatu AmB. Interesujące wydaje się w tym miejscu pytanie, co sprawiają, że spośród dwóch podobnych związków amfoterycyny A ($C_{48}H_{77}NO_{16}$) i B ($C_{47}H_{73}NO_{17}$), tylko AmB jest aktywnym lekiem przeciwgrzybiczym?

Najważniejszą częścią rozprawy jest rozdział *Wyniki i dyskusja wyników* (rozdział 6) obejmujący rezultaty badań własnych wraz z interpretacją. Kolejno, w odpowiednio dobranych warunkach (DMSO i roztwory wodne o różnym pH), określono właściwości i parametry spektralne charakterystyczne dla monomeru, dimeru i tetrameru AmB. Na podstawie wyników eksperymentalnych wspomaganych symulacjami wykorzystującymi metody dynamiki molekularnej, zaproponowano modele dimerów wodnych (równoległe) i błonowych (antyrownoległe) oraz tetramerów. Pokazano także, kinetyki formowania tetrametrów oraz możliwość tworzenia struktur porowatych w wyniku asocjacji dimerów wodnych. Dalej, konsekwentnie w błonach lipidowych zbadano proces organizacji molekularnej AmB oraz wnioskowano o tworzeniu się tetramerów z dimerów błonowych. Badania nie- i posiadających sterole (cholesterol lub ergosterol) liposomów pozwoliły na oszacowanie rozkładu form AmB w błonach modelowych oraz wykazanie, że organizacja molekularna leku zależy od rodzaju i ilości steroli w błonie komórkowej. Uzyskane wyniki potwierdziły możliwość oddziaływania AmB z błonami i tworzenia struktur gąbkopodobnych oraz kanałów transmembranowych. Stosując białko surowicy wołowej (BSA) wykazano, że różna liczba molekuły AmB wiąże się z BSA, a lek wbudowuje się w błony w postaci monomerów i dimerów. Zobrazowano także wpływ AmB zawartej w komercyjnym preparacie *Fungizone* na strukturę *Aspergillus niger*. Zaawansowane eksperymenty opisane w pracy doktorskiej mgr Joanny Sagan zostały zaplanowane i wykonane bardzo precyzyjnie, a poprawna interpretacja wyników dla próbek biologicznych wymagała od Autorki niewątpliwie dużego nakładu pracy oraz wiedzy z zakresu fizyki molekularnej, biofizyki i biologii medycznej, ze względu na interdyscyplinarny charakter badań.

Rozprawa dostarcza bardzo wiele cennych informacji, a jednocześnie nasuwa pewne pytania/komentarze:

- (1) Na rys. 6.4 obserwujemy we wszystkich badanych próbkach składową 0,350 ns, którą przypisano tetramerom w środowisku wodnym, jak można wytłumaczyć jej obecność w DMSO?

- (2) Autorka napisała, że „Składowa czasowa 80 ps pojawiała się tylko i wyłącznie w środowisku o pH 7, tj. PBS.” (s. 82). Jak wynika z rys. 6.4 składową 80 ps obserwujemy także dla AmB w liposomach DPPC.
- (3) Czy wyniki dla AmB inkubowanej 24 h w wodzie alkalizowanej do 12 pH (rys. 6.16c) mogą wskazywać, że nastąpiła całkowita konwersja form dimerycznych w tetrameryczne?
- (4) Jak można wyjaśnić różnicę zliczeń (o rząd wielkości) w liposomach GUV z 10% i 30% zawartością cholesterolu, odpowiednio, rys. 6.22 i 6.24?

Zaprezentowane i przedyskutowane w rozprawie wyniki mgr Joanny Sagan, doprowadziły do konkluzji zebranych w rozdziale *Wnioski*. Przedstawione osiągnięcia znajdują udokumentowanie w przeprowadzonych przez Autorkę badaniach własnych, są właściwie zinterpretowane i poparte odpowiednio cytowaną literaturą. Za najbardziej interesujące moim zdaniem, uważam:

- (1) wykorzystanie czasów życia fluorescencji jako parametru pozwalającego na identyfikowanie różnych form spektralnych AmB,
- (2) pokazanie, że AmB wbudowuje się w płaszczyźnie równoległej i prostopadłej do powierzchni membrany lipidowej, co wskazuje na możliwe dwa mechanizmy oddziaływania z błonami komórkowymi,
- (3) zastosowanie białka, które może pełnić rolę nośnika oraz hamować tworzenie struktur zagregowanych odpowiedzialnych za toksyczność leku; połączenie białka z AmB pokazuje obiecującą alternatywę dla badań nad nowymi lekami o lepszym profilu farmakologicznym i toksykologicznym.

Strona merytoryczna i metodologiczna rozprawy nie budzi, moim zdaniem, żadnych zastrzeżeń. Rozprawa jest opracowaniem wyjątkowo starannym pod względem redakcyjnym i graficznym, co sprawia, że czyta się ją z przyjemnością. Z obowiązku recenzenta, mogłabym zaproponować nieliczne, drobne korekty, które wypisałam poniżej:

1. ogólne uwagi: może warto w opracowaniu zdecydować się na konsekwentne używanie słowa „molekuły” lub „cząsteczki”; w spisie literatury obowiązujący skrót słowa „strony” to „s.”, a nie „ss”;
2. s. 6, publikacja „2. K. Tutaj et al. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 2015, 151, 83-88”, brakuje nazwiska autora korespondencyjnego „R. Luchowski”;
3. s. 38, w opisie wzoru 12 nie ma wyjaśnienia dla symbolu Δ ,
4. s. 63, nazwa rozdziału „5.7. *Aspergillus niger*” powinno być „*Aspergillus niger*”,
5. s. 78, podpis pod rys. 6.10 – „gwizdkami” a powinno być „gwiazdkami”,
6. s. 79, linia 5, „W widmie.....widoczne jest w ogonie...” może raczej „na zboczu”?
7. s. 80, opis Tabeli 6, „Udział procentowy (liczony po intensywnościach)...” może „na podstawie”;

8. s. 102, linia 2/3, „(...lipidów, wartość anizotropii).”?
9. s. 120,123, publikacje [107], [163] – brakuje pełnych danych bibliograficznych.

Pani mgr Joanny Sagan jest współautorem czterech publikacji (w tym manuskryptu złożonego do druku) w specjalistycznych czasopismach z listy JCR o znaczących wskaźnikach *imapct factor* (*The Journal of Physical Chemistry B* (IF – **3,187**), *Journal of Photochemistry and Photobiology B* (IF – **3,035**), *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (IF – **5,671**)). Dodatkowo należy podkreślić, że Autorka rozprawy była stypendystką Fundacji na rzecz Nauki Polskiej i realizowała swoje badania w ramach programu *Team* pt. „*Molecular Spectroscopy for BioMedical Studies*”. Stworzyło jej to szerokie możliwości rozwoju naukowego, umożliwiło pracę z wysokiej klasy specjalistami z zakresu biologii medycznej i biofizyki molekularnej oraz pozwoliło na pracę w laboratorium wyposażonym w wysokozaawansowaną aparaturę. Zdobyte doświadczenie wykorzystała podczas badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, stosując m.in. techniki pozwalające na obrazowanie pojedynczych molekuł. Na uznanie i wyróżnienie w rozprawie pani mgr Joanny Sagan zasługuje, konsekwencja realizacji celów pracy, szczegółowa weryfikacja i zaawansowana oraz wnikliwa analiza wyników. Na podstawie sformułowanych perspektyw (rozdział 8) można sądzić, że Autorka jest dobrze przygotowana i zdeterminowana do prowadzenia dalszej pracy naukowej.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera liczne, oryginalne i cenne z naukowego punktu widzenia wyniki badań, które wnoszą wkład do zrozumienia mechanizmu działania amfoterycyny B na poziomie molekularnym oraz zaproponowania nowej formuacji leku pozwalającej na rozdzielenie jego farmakologiczne pożądaney i toksycznej aktywności.

Moim zdaniem, oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez „Ustawę o stopniach naukowych i tytule...” z 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami), dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, wniosek o przyjęcie mojej rekomendacji i dopuszczenie jej Autorki, mgr Joanny Sagan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

