



UNIVERSITY of GDAŃSK

Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki

Prof. Dr hab. Piotr Bojarski

Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki

Instytut Fizyki Doświadczalnej

Zakład Spektroskopii Molekularnej

Gdańsk, 31.08.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Sagan

„Badanie samoorganizacji antybiotyku polienowego Amfoterycyny B metodami spektroskopii molekularnej”

Badania nad mechanizmami molekularnymi działania leków przeciwgrzybiczych zaliczają się obecnie do najistotniejszych nurtów badań zarówno ze względów poznawczych, aplikacyjnych jak i społecznych. Umożliwiają one bowiem z jednej strony zrozumienie zasady działania danego leku i sposobu jego dostarczania do danego miejsca organizmu na poziomie molekularnym, z drugiej zaś strony pozwalają bardziej świadomie projektować leki nowej generacji – bardziej skuteczne, mniej toksyczne i tańsze – wyczekiwane w związku z masowym rozwojem w ostatnich dekadach ciężkich powikłań w długotrwałym leczeniu poważnych chorób cywilizacyjnych.

Mechanizmy molekularne, o których mowa, są uwarunkowane nie tylko budową chemiczną cząsteczek leku ale też m.in. sposobem ich oddziaływania z błonami komórkowymi, sposobem ich dostarczania i uwalniania oraz formą organizacji molekularnej cząsteczek leku odpowiedzialnej za działanie terapeutyczne czy skutki uboczne.

Amfoterycyna B i niektóre jej pochodne zaliczają się do bardzo ważnej grupy antybiotyków polienowych ratujących życie i zdrowie osób chorujących na ostre grzybice. Mimo licznych badań nad mechanizmami działania tego leku zarówno leczniczymi jak i cytotoksycznymi pozostają one wciąż nie

do końca jasne. Do takiego właśnie ważnego i aktualnego nurtu prac nad podstawami działania Amfoterycyny B i pokrewnych leków zalicza się rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Sagan.

Omawiana praca doktorska ma charakter klasycznej rozprawy. Praca jest raczej zwarta a jej konstrukcja formalna nie różni się zbytnio od innych rozpraw doktorskich. Po ciekawie zarysowanym przeglądzie aktualnego stanu badań Autorka przedstawia cele i hipotezy badawcze, po których następują omówienie warsztatu i procedur laboratoryjnych, aparaturowych i to co najważniejsze, czyli własne oryginalne wyniki badawcze wraz z ich analizą. Pracę kończy zestaw najważniejszych konkluzji oraz obszerny spis literatury liczący 178 pozycji.

Metody spektroskopii molekularnej a szczególnie metody absorpcyjne i luminescencyjne przy wzbudzeniu ciągłym oraz impulsowym dostarczają bardzo cennych informacji o strukturze i organizacji przestrzennej emitujących indywiduów, zatem wybór tych technik jako wiodących w tej pracy należy uznać za właściwy i dobrze przemyślany. Sposób przedstawienia przez Doktorantkę metodologii pracy doświadczalnej i preparatyki badanych układów świadczy o dobrej, bardzo solidnej jakości pracy laboratoryjnej doktorantki.

Amfoterycyna B może występować w różnych formach molekularnych: w postaci niezagregowanej (monomerowej), dimerowej czy tetramerowej. Okazuje się, że forma molekularna, w której zorganizowane są molekuly tego antybiotyku w środowiskach biologicznych może mieć silny wpływ zarówno na efekty terapeutyczne jak i toksyczne działanie tego leku.

Cenne informacje o różnych formach molekularnych Amfoterycyny B Doktorantka pozyskała dzięki pomiarom zaników natężenia fluorescencji i wyliczonym na ich podstawie średnim czasom życia fluorescencji. Analiza numeryczna przeprowadzonych pomiarów z całą pewnością nie jest trywialna. Jednak założenia przyjęte przez Doktorantkę podczas systematycznych obliczeń prowadzonych przy różnych parametrach są sensowne i dowodzą, że Amfoterycyna B może występować w formie monomerów, dimerów równoległych (formujących się typowo w środowisku wodnym), antyrównoległych (formujących się typowo w membranach) oraz tetramerów powstających z par dimerów. Bardzo ważne w tym ostatnim kontekście są wyniki pomiarów techniką korelacji fluorescencji, które wskazują na samorzutny sposób formowania się agregatów z mniejszych jednostek, przy czym ostatnim ogniwem tej reakcji jest powstawanie tetramerów z par dimerów.

Ciekawych informacji o oddziaływaniu Amfoterycyny B z membranami lipidowymi dostarczają różne fluorescencyjne metody obrazowania próbek wykorzystane w pracy. Kilka ciepłych słów warto poświęcić zwłaszcza wynikom uzyskanym raczej niestandardową metodą mikroskopowego obrazowania anizotropii emisji. Doktorantka trafnie wykorzystała bardzo dużą wrażliwość anizotropii

emisji na molekularne efekty orientacyjne. W wyniku tego udało się określić dwa odmienne sposoby wbudowywania się Amfoterycyny B w membranę (równoległe i prostopadle do powierzchni membrany), gdyż różnie wbudowane indywidua odznaczają się inną skłonnością do ograniczonych ruchów obrotowych, co przekłada się na wartości anizotropii emisji. Generalnie analiza wyników uzyskanych tą metodą pozwala na sformułowanie jednego z kluczowych wniosków pracy o mieszanym mechanizmie oddziaływania Amfoterycyny B z membranami biologicznymi (gromadzenie się tzw. gąbek molekularnych amfoterycyny B przy powierzchniach błon oraz formowanie kanałów transmembranowych z tetramerów tej molekuly). Wniosek ten uważam za w pełni wiarygodny i bardzo ważny z punktu widzenia badania mechanizmów molekularnych działania tego leku. Z kolei obrazowanie czasów życia fluorescencji (FLIM) i obrazowanie samego rozkładu natężeń fluorescencji w próbkach wnosi ważną informację o dostarczaniu Amfoterycyny B do membran lipidowych za pośrednictwem białek transportujących. W pracy wykorzystano zapewne z powodów ekonomicznych głównie białko BSA, zawsze przy tej okazji warto jednak prace wzbogacić o ludzkie białko transportujące (HSA). Dobrze, że Doktorantka dostrzegła taką potrzebę na przyszłość w końcowej fazie doktoratu. Ostatni króciutki rozdział pracy poświęcony aktywności przeciwgrzybiczej Amfoterycyny B jest raczej pozytywnym sygnałem co do sensowności prowadzenia dalszych systematycznych badań w tym zakresie. Zaprezentowane rozkłady anizotropii emisji w próbkach dla kilku chwil czasu po aplikacji leku (do 90 minut) świadczą o jego wpływie na strukturę grzybni. Wydaje się jednak, że są potrzebne systematyczne badania w tym kontekście i że wymagałyby one m.in. znacznego wydłużenia czasu oddziaływania leku na grzybnię zapewne do kilku tygodni lub dłużej.

Wyniki przedstawione w rozprawie zostały już w dużej części części opublikowane w czterech pracach współautorskich. W jednej z nich Pani mgr J. Sagan jest pierwszą autorką. Wszystkie prace opublikowano w bardzo dobrych czasopismach naukowych jak J. Phys.Chem. B, J. Photochem.Photobiol B czy Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine czy wreszcie w bardzo prestiżowym Scientific Reports, co też świadczy o wysokiej wadze prowadzonych badań. Z porównania zawartości tych prac i rozprawy wydaje się, że powinny powstać na podstawie zebranego materiału jeszcze dalsze prace. Porównanie treści pracy i publikacji świadczy też o istotnej roli doktorantki w przygotowaniu materiału do dotychczas opublikowanych prac.

W przedstawionej pracy doktorskiej dostrzegłem też trochę drobnych błędów o charakterze pisarskim i językowym, które pominę jako trywialne i kilka nieścisłości. Lektura pracy nasuwa też jak zwykle pewne pytania.

Str. 52 – pierwsze zdanie od góry jest niezbyt szczęśliwie skonstruowane – rozumiem, że Autorce chodzi o określenie, że najlepszą czułość (i optymalne warunki pomiarowe) detektor posiada przy napięciu 900 V.

Str.55 – opis warunków pomiarów czasowo-rozdzielczych w układzie mikroskopu konfokalnego:

Opis jest nieco nieprecyzyjny – powinno być – „szerokość połówkowa impulsu” a nie szerokość impulsu równa 52 ps. Co Autorka rozumie przez rozdzielczość czasową 16 ps ? Czy chodzi o szerokość kanału w metodzie TCSPC czy minimalny czas zaniku fluorescencji jaki można sensownie określić z pomiarów? Dalej - czas odpowiedzi aparatury 300 ps – proszę o komentarz w tym samym kontekście.

Str.56 – nieścisłości (które w danym kontekście nie prowadzą do nieporozumień) w rodzaju: - „pomiar pojedynczych cząsteczek” czy „pomiar spektroskopii korelacji fluorescencji”

Pytanie do obrazowania anizotropii emisji - czy pomiar obu składowych natężenia światła był prowadzony jednocześnie, czy w tym samym oknie czasowym dla obu detektorów rejestrujących obie składowe czy jak to zwykle bywa dla każdej składowej oddzielnie? Jaki jest błąd tego pomiaru?

Str.68 – zamiast intensywność lepiej po polsku pisać natężenie światła.

Na tej samej stronie - można się zastanawiać czy nie warto by wrócić do pomiaru zaniku natężenia fluorescencji przy wykorzystaniu lasera o znacznie krótszym FWHM impulsu. Pozwoliło by to zapewne określić dokładniej najkrótszą składową czasową. Obecnie znane jest tylko jej oszacowanie od góry (<10 ps wg Doktorantki).

W pracy dokonano klasyfikacji różnych form amfoterycyny B na monomer, dimer i tetramer. Jest to zgodne z innymi danymi literaturowymi i wcześniejszymi obserwacjami i nie mam wątpliwości, że jest to prawda. Czy jednak można określić przyczynę na poziomie molekularnym dla której nie tworzą się tryмеры (np. z połączenia monomeru i dimeru)? Prosiłbym o krótki komentarz.

Str.91 – Nieścisłość w sformułowaniu „Dodatek 5% molowych AmB powoduje niewielki spadek dimerów...”

Komentarz – moim zdaniem warto byłoby w przyszłości wykonać systematyczne badanie wiązania amfoterycyny B nie tylko z białkiem BSA ale też ludzkim białkiem transportującym (HSA). Zapewne są to znacznie droższe badania ale i wyniki mogą nieść pewną wartość dodaną z punktu widzenia mechanizmu dostarczania leku. Prosiłbym o krótki komentarz w tym kontekście.

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Sagan zawiera istotne elementy nowości naukowej, przede wszystkim pogłębia wiedzę o mechanizmach molekularnych oddziaływania amfoterycyny B z membranami biologicznymi. W szczególności w pracy doktorantka przekonująco udowodniła mieszany typ mechanizmu oddziaływania amfoterycyny B z błonami lipidowymi. Wiedza ta powinna się okazać bardzo przydatna przy opracowywaniu leków nowszej generacji bazujących na amfoterycynie B. Recenzowana rozprawa spełnia z nadwyżką wszelkie ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Poczynione przeze mnie uwagi są drobne i nie wpływają istotnie na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Joanny Sagan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wysoka wartość merytoryczna uzyskanych wyników naukowych i zaprezentowany w pracy bardzo dobry warsztat naukowy skłaniają mnie do złożenia wniosku o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

