

Autoreferat

**Woda hydratacyjna w systemach o znaczeniu biologicznym:
wpływ promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni oraz
endogennego pola elektrycznego.**

dr Magdalena Kowacz

Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności

Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Olsztyn, 2022

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
4.2. Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe.....	4
4.3. Omówienie problematyki badawczej podejmowanej w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego.....	5
4.4 Cel naukowy.....	9
4.5. Omówienie wyników badań.....	9
4.6. Podsumowanie.....	25
4.7. Bibliografia.....	27
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	29
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	34
7. Inne informacje dotyczące kariery naukowej.....	35

1. Imię i nazwisko

Magdalena Kowacz

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2009 **Doktor nauk przyrodniczych** (*Doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.*)
University of Münster, Münster, Niemcy
Tytuł rozprawy doktorskiej: „The effect of additives on water structure and solute hydration: Consequences for crystal nucleation, growth and dissolution”. (*summa cum laude*)
Promotor: Prof. Andrew Putnis
- 2003 **Magister oceanologii**, specjalizacja – oceanografia fizyczna, ścieżka - oceanografia chemiczna
Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii
Tytuł pracy magisterskiej „Fotochemiczna degradacja polisacharydów w wodach naturalnych”.
Promotor: dr hab. Waldemar Grzybowski

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

07. 2021 - dziś **Adiunkt**
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
09. 2018 - 09. 2020 **Visiting Assistant Professor**
University of Washington, Dept. of Bioengineering, Seattle, USA
12. 2015 – 10. 2018 **Adiunkt**
Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
01. 2010 – 12. 2015 **Postdoc Researcher**
ITQB - Institute of Chemical and Biological Technology António Xavier, New University of Lisbon, Oeiras, Portugalia

11. 2006 – 10. 2009 **Visiting Researcher**
University of Münster, Münster, Niemcy
11. 2005 -11. 2006 **Research Fellow**
University of Aveiro, Aveiro, Portugalia

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Woda hydratacyjna w systemach o znaczeniu biologicznym: wpływ promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni oraz endogenego pola elektrycznego.

4.2. Lista publikacji wchodzących w skład cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe

1. **Kowacz M.***, Marchel M., Juknaite L., Esperança J. M. S. S., Romão M. J., Carvalho A. L. *, Rebelo L. P. N. * (2017) Infrared light-induced protein crystallization. Structuring of protein interfacial water and periodic self-assembly. *J. Crystal Growth*, 457, 362, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.01.003>
IF = 1,742; MEiN = 70; cyt. 6; cyt. bez autocyty. 4
2. **Kowacz M.***, Warszzyński P. (2018) Effect of infrared light on protein behaviour in contact with solid surfaces. *Colloids Surf.*, 557, 94, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.03.016>
IF = 3,131; MEiN = 70; cyt. 1; cyt. bez autocyty. 0
3. **Kowacz M.***, Warszzyński P. (2019) Beyond esterase-like activity of serum albumin. Histidine-(nitro)phenol radical formation in conversion cascade of p-nitrophenyl acetate and the role of infrared light. *J Mol Recognit.* e2780, <https://doi.org/10.1002/jmr.2780>
IF = 2,214; MEiN = 70; cyt. 3; cyt. bez autocyty. 2
4. **Kowacz M.***, Pollack G. (2019) Moving water droplets: The role of atmospheric CO₂ and incident radiant energy in charge separation at the air-water interface. *J. Phys. Chem. B*, 123, 51, 11003, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09161>
IF = 2,857; MEiN = 140; cyt. 7; cyt. bez autocyty. 7

5. **Kowacz M.***, Pollack G. (2020) Cells in New Light: Ion Concentration, Voltage, and Pressure Gradients Across a Hydrogel Membrane. *ACS Omega*, 5, 21024, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02595>

IF = 3,512; *MEiN* = 70; *cyt.* 5; *cyt. bez autocyt.* 4

6. **Kowacz M.***, Pollack G. (2020) Propolis-induced exclusion of colloids: Possible new mechanism of biological action. *Colloid Interface Sci. Comm.* 38, 100307, <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100307>

IF = 4,914; *MEiN* = 70; *cyt.* 5; *cyt. bez autocyt.* 4

* autor korespondencyjny

Oświadczenia współautorów stanowią Załączniki 5.1 – 5.6

Sumaryczne dane naukometryczne dla artykułów z cyklu:

IF = 18,37

MEiN = 490

Cytowania (bez autocytowań) wg. bazy Scopus = **21**

4.3. Omówienie problematyki badawczej podejmowanej w ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego

Analiza procesów biologicznych na poziomie molekularnym wymaga rozważenia roli cząsteczek wody, które są strukturalnie i funkcjonalnie związane z powierzchnią (np. cząsteczki biologicznej czy organelum komórkowego) biorącą udział w danym procesie. Jest to *woda powierzchniowa* lub innymi słowy *woda hydratacyjna*, która ma inną strukturę i właściwości niż woda w roztworze. Wraz ze zmniejszeniem skali obserwacji do rozmiarów nano, czyli na przykład do wielkości cząsteczek białka, drastycznie wzrasta znaczenie powierzchni w definiowaniu właściwości całego układu (za względu na zwiększający się stosunek powierzchni do masy/objętości). Powierzchnie stanowiące strefę kontaktu dla przebiegu procesów biologicznych są uwodnione. W gęsto upakowanym środowisku wewnątrzkomórkowym cała woda jest w zasadzie *wodą powierzchniową*, związaną bądź to ze strukturami komórkowymi, bądź z cząsteczkami biologicznymi wypełniającymi cytoplazmę. **Zarówno właściwości samej wody hydratacyjnej, jak i uwodnionej powierzchni są od siebie wzajemnie zależne. I właśnie te obustronne interakcje w systemach o znaczeniu biologicznym są przedmiotem**

moich badań. Ze względu na polarny charakter cząsteczek wody, czynnikiem wpływającym na oddziaływanie woda-powierzchnia jest między innymi pole elektryczne i elektromagnetyczne. **Przedstawione osiągnięcie skupia się w szczególności na oddziaływaniu na procesy na granicy faz woda/powierzchnia (i) pola elektrycznego generowanego wewnątrz układu oraz (ii) niejonizującego promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (IR) dostarczanego w postaci bodźca zewnętrznego.** IR o długości fal silnie absorbowanych przez cząsteczki wody, poza polaryzacją, wzbudza ich drgania oscylacyjne. IR jest bardzo powszechną formą energii pochodzącą z promieniowania słonecznego czy ciepła metabolicznego.

W przypadku białek, biomakrocząsteczka i jej woda powierzchniowa stanowią strukturalną i funkcjonalną całość. Białka wykazują aktywność biologiczną tylko przy odpowiednim stopniu uwodnienia. Cząsteczki wody zapewniają białku właściwą plastyczność i umożliwiają funkcjonalne zmiany konformacji.¹⁻⁴ Ponadto funkcjonalne oscylacje struktury białka często wiążą się z przejściowym uwolnieniem części wody hydratacyjnej i ten wzrost entropii układu może być wykorzystany jako źródło energii dla wykonania określonej pracy, np. skurczu włókien mięśniowych.^{1,5} Uwolnienie wody hydratacyjnej to również główna składowa energetyczna odpowiedzialna za zwijanie białek, czyli utrzymanie ich biologicznie aktywnej konformacji.⁶ Podobnie w przypadku błon komórkowych, będących strukturami lipidowymi, odpowiedź na bodźce chemiczne lub mechaniczne jest ściśle zależna od stopnia uwodnienia.⁷ Cząsteczki wody spolaryzowane przy powierzchni, to znaczy ułożone w sposób uporządkowany w jej polu elektrycznym, działają także jak swoisty przewodnik umożliwiający ukierunkowany transport protonów lub innych jonów.⁸⁻¹² Kontrolowane przenoszenie ładunków jest natomiast niezwykle istotne dla przebiegu i wydajności reakcji enzymatycznych i funkcjonowania kanałów jonowych w błonie komórkowej. Wzajemnie skorelowane cząsteczki wody powierzchniowej pełnią także rolę molekularnych mostków koordynujących np. wiązanie białka z ligandem.¹³ Zbadanie współoddziaływania wody i powierzchni może przyczynić się do głębszego zrozumienia, jak również ukierunkowanej modyfikacji procesów biologicznych.

Hydrofobowość. Powierzchnie, w tym również biologiczne, ze względu na ich powinowactwo do wody mogą mieć charakter hydrofilowy (powierzchnie polarne lub posiadające ładunek elektryczny) lub hydrofobowy. Złożone pod względem chemicznym cząsteczki biologiczne, jak białka czy fosfolipidy (w błonie komórkowej) zawierają w swojej strukturze domeny o różnym powinowactwie do wody. Domeny hydrofobowe ze względu na wysokie napięcie powierzchniowe na styku woda/powierzchnia mają tendencję do

zmniejszania kontaktu z wodą, np. w procesie tworzenia dwuwarstwy lipidowej (błona komórkowa) czy też zwijania (fałdowania) białek. Hydrofobowość jest więc ważnym czynnikiem w kształtowaniu funkcjonalnych struktur biologicznych. Wprawdzie hydrofobowy rdzeń białka ukryty jest wewnątrz jego struktury, ale na eksponowanej do wody powierzchni biomakrocząsteczki wciąż pozostaje wiele domen o charakterze hydrofobowym. Aby zapewnić im kompatybilność z roztworem wodnym, a więc obniżyć napięcie powierzchniowe, domeny te dekorowane są jonami o niskiej gęstości ładunku (wykazującymi powinowactwo do części hydrofobowych) lub cząsteczkami o charakterze amfifilowym.¹⁴ W przypadku niedostatecznego uwodnienia powierzchniowych domen hydrofobowych może nastąpić niespecyficzna agregacja białek, spowodowana wzajemnym powinowactwem domen.¹⁵ Natomiast w konsekwencji adsorpcji amfifili zbyt silnie oddziałujących z wodą, może dojść do rozwinięcia białka, a zatem utraty struktury i funkcjonalności. Delikatna równowaga pomiędzy uwodnieniem a wykluczeniem ze środowiska wodnego zapewnia więc białkom ich natywną konformację i aktywność biologiczną. Ze względu na fakt, że powierzchnia styku domen hydrofobowych z roztworem wodnym ma tak kluczowe znaczenie biologiczne, podejmuje się próby jej modelowania za pomocą kontaktu międzyfazowego woda/powietrze.¹⁶ Jest to najprostszy układ, w którym powietrze ma rozpoznany charakter hydrofobowy i eksperymentalnie udokumentowano, że woda w kontakcie z powietrzem zyskuje ujemny ładunek powierzchniowy. Mechanizm powstawania tego ładunku, przewidywanego również na niepolarniej powierzchni białka, jest natomiast wciąż słabo rozpoznany.¹⁶⁻¹⁸

Hydrofilowość. W przypadku domen hydrofilowych, oddziaływanie z cząsteczkami wody odbywa się dzięki obecności zjonizowanych lub polarnych grup funkcyjnych. Wynika to z dipolowego charakteru cząsteczek samej wody, który jest również podstawą tworzenia wiązań wodorowych i tzw. kolektywnego efektu. Ten ostatni wyraża się we wzajemnej polaryzacji i wzmocnieniu oddziaływań cząsteczek wody oraz wzmocnieniu ich zsynchronizowanej odpowiedzi na pole elektryczne.¹⁹ Dzięki tym właściwościom woda spolaryzowana w wyniku oddziaływania z powierzchnią może tworzyć wielocząsteczkowe domeny efektywnie działające jako jeden kolektywny dipol.²⁰ Na powłokę hydratacyjną może więc składać się wiele warstw cząsteczek wody wykazujących kolektywną dynamikę, właściwości elektryczne i reagujących na bodźce jako skoordynowana całość. Umożliwia to ukierunkowane przewodnictwo jonów i pośredniczenie w procesie tworzenia specyficznych kontaktów między oddalonymi od siebie cząsteczkami, jak również ma znaczny wkład w entropię układu.

Pole elektryczne. Prace Samoiloვა, do których odnosiłam się wielokrotnie w moich publikacjach dotyczących wody powierzchniowej w systemach abiotycznych,¹⁴ wykazały, że

woda hydratacyjna jest dodatkowo stabilizowana przez obecność jonów o ładunku przeciwnym do ładunku uwodnionej powierzchni. Oznacza to, że dipole wody są uporządkowane w polu elektrycznym utworzonym poprzez rozdział ładunków przy powierzchni. Rozdział ładunków, a więc różnica potencjałów elektrycznych, jest jedną z podstawowych cech każdej żywej komórki i wyraża się w postaci potencjału błonowego.²¹ Niewiele jest danych na temat wpływu tego lokalnego napięcia elektrycznego na strukturę wody powierzchniowej (czy też wewnątrz-błonowej) towarzyszącej komórce. Towarzysząca komórce warstwa wody tzw. niemieszalnej (z ang. *unstirred water layer*)²² jest szczególnie rozwinięta dla śródbłonek naczyń krwionośnych. Dzięki temu erytrocyty poruszają się tylko w świetle naczynia, a strefa przy jego ściankach jest od nich wolna.²³ Śródbłonek natomiast znany jest z obecności porów działających jak swoiste sita w stosunku do jonów i innych substancji rozpuszczonych.²⁴ Selektywna przepuszczalność porów, względem jonów o określonym znaku, może skutkować rozdziałem ładunków, a co za tym idzie uporządkowaniem cząsteczek wody w polu elektrycznym. Także prace Derjaguina wskazują, że warstwa wody powierzchniowej wolna od cząstek zawieszonych obserwowana wokół komórek może być wynikiem ich selektywnej przepuszczalności i generowanej w ten sposób różnicy stężeń jonów/ładunków elektrycznych.²⁵ Charakterystyka strukturalna powierzchni biologicznych (np. średnica i ładunek porów) może więc determinować właściwości elektryczne w strefie kontaktu woda/powierzchnia, a co za tym idzie także organizację wody hydratacyjnej.

Promieniowanie elektromagnetyczne. Cząsteczki wody ulegają polaryzacji (uporządkowaniu) dzięki oddziaływaniu z ładunkami elektrycznymi powierzchni. Warto jest podkreślić, że jednoimiennie naładowane grupy funkcyjne związane z powierzchnią odpychają się wzajemnie, a ponieważ nie mogą się przestrzennie oddalić od siebie, oscylują na powierzchni w sposób zsynchronizowany. Oscylacja ładunków elektrycznych jest źródłem *promieniowania elektromagnetycznego*. Oznacza to, że cząsteczki wody powierzchniowej poddane są oddziaływaniu nie tylko pola elektrycznego, ale również elektromagnetycznego.²⁶ Ze względu na charakter oscylacji (znacznie poniżej energii przejść elektronowych) emitowane promieniowanie elektromagnetyczne jest promieniowaniem z zakresu podczerwieni. Wyniki badań eksperymentalnych pokazały, że ten rodzaj promieniowania sprzyja rozbudowie warstwy hydratacyjnej.^{27,28} Mechanizm warunkujący odpowiedź wody powierzchniowej na fale z zakresu podczerwieni nie został jeszcze w pełni rozpoznany. W serii swoich prac Shatalov sugeruje, że niejonizujące promieniowanie elektromagnetyczne, do którego należy podczerwień, wpływa na właściwości wody poprzez oddziaływanie z zawartymi w niej pęcherzykami gazu.²⁹⁻³¹ Wyniki moich prac również są zgodne z tymi obserwacjami.³²

Ponieważ wszystkie płyny ustrojowe zawierają pewną ilość pęcherzyków gazu, prace Shatalov'a wskazały na możliwość wpływu promieniowania elektromagnetycznego na procesy biologiczne, a konkretnie agregację erytrocytów i choroby układu krążenia. Ponadto tzw. niskoenergetyczne promieniowanie laserowe stosowane jest z pozytywnym skutkiem w różnych formach terapii.³³ W przypadku podczerwieni na przykład ekspozycja na promieniowanie z tego zakresu chroniła DNA przed niszczącym wpływem fal ultrafioletowych.³⁴

4.4 Cel naukowy

Warstewka wody powierzchniowej oraz uwodniona powierzchnia biologiczna stanowią strukturalną i funkcjonalną całość. Dzięki temu, że cząsteczki wody są dipolami, mogą ulegać polaryzacji i uporządkowaniu w polu elektrycznym powierzchni oraz wykazywać kolektywną dynamikę i właściwości elektryczne. Promieniowanie elektromagnetyczne powoduje dodatkowo drgania oscylacyjne cząsteczek wody. Określone właściwości fizykochemiczne powierzchni biologicznych (np. struktura i ładunek) odpowiadają natomiast za generowanie (endogenne) pola elektrycznego i elektromagnetycznego, a zatem wpływają na charakterystykę warstwy hydratacyjnej i związane z nią procesy biologiczne. Celem mojej pracy było zbadanie **wpływu podczerwieni oraz endogenne pola elektrycznego na wodę hydratacyjną, jako czynnika determinującego właściwości i funkcje struktur biologicznych.**

4.5. Omówienie wyników badań

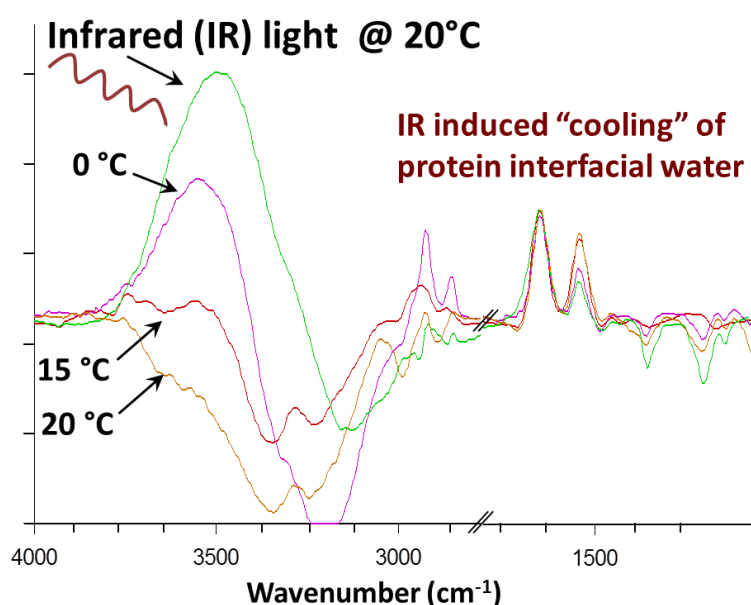
Wpływ promieniowania podczerwonego na wodę hydratacyjną i samoorganizację cząsteczek białka w roztworze.

Kowacz M., Marchel M., Juknaite L., Esperança J. M. S. S., Romão M. J., Carvalho A. L., Rebelo L. P. N. (2017) Infrared light-induced protein crystallization. Structuring of protein interfacial water and periodic self-assembly. *J. Crystal Growth*, 457, 362, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.01.003>

Niespecyficzna agregacja białek jest nie tylko ważnym problemem w krystalografii rentgenowskiej białek, ale także czynnikiem leżącym u podstaw wielu procesów chorobowych,

w szczególności neurodegeneracyjnych.¹⁵ Niespecyficzna agregacja wiąże się z utratą natywnej konformacji białka (która odpowiada za jego biologiczną aktywność), jak również uniemożliwia tworzenie kryształów wykorzystywanych do celów badawczych dla rozpoznania struktury i mechanizmu działania białek. Odpowiedni poziom uwodnienia białka ma krytyczne znaczenie dla jego struktury i funkcjonalności, a także jest niezbędny dla integralności kryształów tworzonych przez biomakrocząsteczki. Doniesienia naukowe wskazują natomiast, że promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu podczerwieni (IR) sprzyja uwodnieniu powierzchni hydrofilowych.²⁷ **Celem omawianej pracy było zbadanie wpływu IR na hydratację i samoorganizację cząsteczek białka w roztworze.** Do prac eksperymentalnych wybrano trzy białka: lizozym jaja kurzego, mioglobinę (z mięśnia szkieletowego konia) oraz hemoglobinę (z krwi wołowej). Główną metodykę badań stanowiła analiza widma białek w podczerwieni przy zastosowaniu techniki osłabionego całkowitego odbicia (z ang. *Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR*).

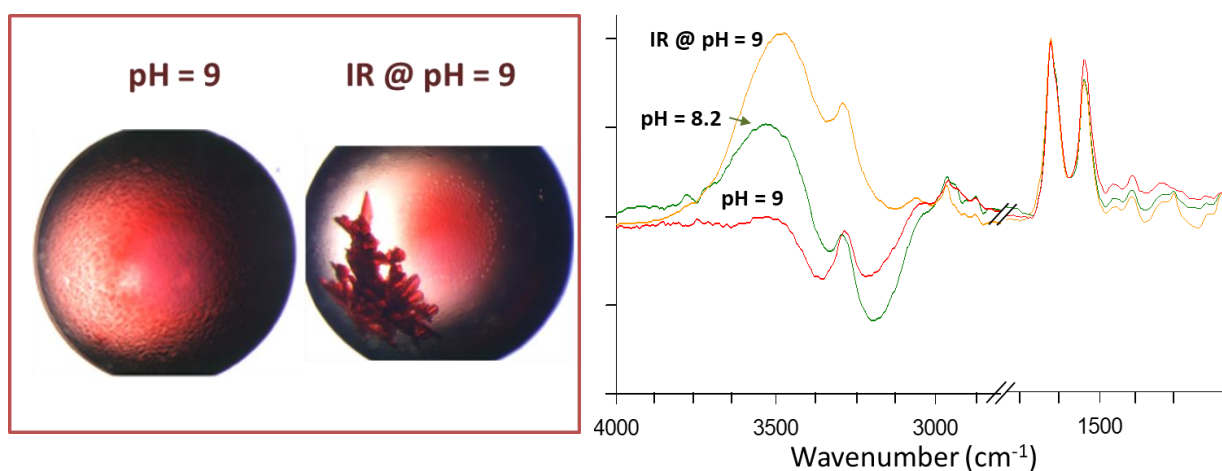
Uzyskane wyniki wykazały, że IR o długości fal silnie absorbowanych przez cząsteczki wody ($\lambda = 2900$ nm, emitowanej przez diody LED) powoduje wzmocnienie współdziałania i siły wiązań wodorowych oraz zwiększoną polaryzację warstwy hydratacyjnej białka. Szczególnie interesujące okazało się porównanie wpływu IR z efektem obniżenia temperatury roztworu lub jonizacji białka w obecności buforu. W każdym przypadku zaobserwowano zbliżone zmiany w widmie ATR-FTIR, wskazujące na zwiększone ustrukturyzowanie wody w warstwie hydratacyjnej (rys. 1). Obniżenie temperatury skutkuje większą tendencją cząsteczek wody do tworzenia wiązań wodorowych (zmiany w kierunku od



Rys. 1 Zmiany widma ATR-FTIR lizozymu w zależności od temperatury i ekspozycji na IR. Absorbancja przy ~ 3500 cm⁻¹ pochodzi od wibracji O-H wiązań wodorowych (odzwierciedla wodę hydratacyjną)

cieczy do struktury lodu), natomiast ładunek elektryczny na powierzchni białka (zależny od pH roztworu) wzmacnia oddziaływanie z dipolami wody skutkując większym uporządkowaniem tych ostatnich. Oddziaływanie IR miało podobny wpływ na warstwę wody powierzchniowej białka pomimo tego, że IR jest rozpoznany źródłem ciepła i jest promieniowaniem niejonizującym. Wynika z tego, że wibracje wiązań cząsteczek wody wzbudzone przez IR, sprzyjały agregacji molekuł wody hydratacyjnej białka. Podobny efekt IR zaobserwowano także dla innych powierzchni hydrofilowych.²⁷ W reakcji na IR zwiększał się także potencjał Zeta białka odzwierciedlający jego ładunek powierzchniowy. Co istotne, potencjał Zeta może być regulowany także przez polaryzację warstwy hydratacyjnej.²⁸ Polaryzacja natomiast zależy od uporządkowania cząsteczek wody.

Rozbudowana w wyniku oddziaływania z IR warstwa hydratacyjna białka, przedstawiona w omawianej pracy, zapobiegała niespecyficzej agregacji białka w roztworze i sprzyjała samoorganizacji jego cząsteczek z zachowaniem natywnej (aktywnej biologicznie) konformacji. Efekty te zostały potwierdzone eksperymentalnie poprzez obserwację agregacji cząsteczek białka w roztworze, w którym warunki pH i stężenia jonów zostały dobrane tak, by wzbudzić wzajemne oddziaływania białko-białko. Przy braku ekspozycji na promieniowanie IR środowisko reakcji sprzyjało niespecyficzej agregacji. Natomiast oddziaływanie z podczerwienią przy zachowaniu tych samych warunków umożliwiało tworzenie specyficznych kontaktów międzycząsteczkowych i krystalizację białka w jego zwiniętej (aktywnej) formie (rys. 2). Ekspozycja na IR obniżyła także graniczną wartość stężenia białka, przy której można było uzyskać kryształy: o 20 % w przypadku hemoglobiny i aż o 80 % dla mioglobiny.



Rys. 2 Lewy panel: niespecyficzna agregacja hemoglobiny przy pH = 9 oraz kryształy białka w tych samych warunkach, ale po ekspozycji na IR.

Prawy panel: zmiany w widmie ATR-FTIR hemoglobiny (w obszarze odpowiadającym absorpcji wody hydratacyjnej $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$) w warunkach sprzyjających krystalizacji (pH = 8,2 oraz pH = 9 po ekspozycji na IR) oraz skutkujących agregacją białka (pH = 9).

Efekt ten potwierdza zależność, zgodnie z którą uwolnienie wody hydratacyjnej jest główną składową energetyczną odpowiedzialną za krystalizację.⁶ Wynika z tego, że rozbudowana w reakcji na IR warstwa hydratacyjna oznaczała wzrost entropii (mobilności cząsteczek wody) podczas tworzenia kontaktów międzycząsteczkowych białko-białko.

Uzyskane wyniki mogą mieć nie tylko praktyczne konsekwencje dla krytalografii białek, ale również wskazywać na znaczenie w procesach biologicznych ciepła metabolicznego (emitowanego w podczerwieni) oraz naturalnej ekspozycji na słońce, a także możliwy mechanizm działania fal z zakresu podczerwieni.

Badania te wykonane zostały w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego nr PTDC/BBB-BEP/3058/2012 finansowanego przez portugalską Fundację dla Nauki i Technologii (*Fundação para a Ciência e a Tecnologia*) (Zał. 4, poz. II.3.1. a (3)). Ich wyniki zostały przedstawione między innymi na wykładzie na zaproszenie na międzynarodowej konferencji naukowej *16th International Conference on Crystallization of Biological Macromolecules 2016* w Pradze (Zał.4, poz. II.2.1.a (4)).

Wpływ promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni na oddziaływanie białka z powierzchnią stałą.

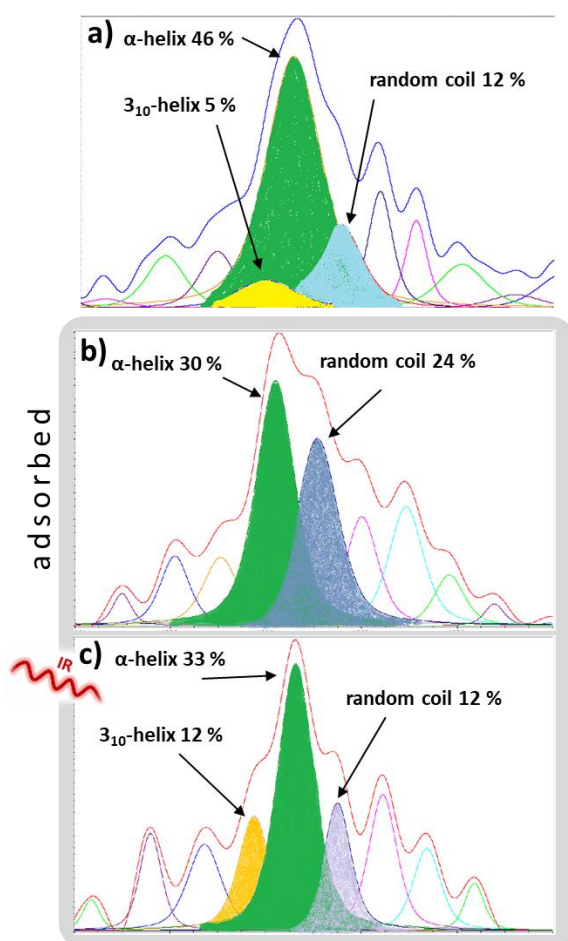
Kowacz M., Warszyński P. (2018) Effect of infrared light on protein behaviour in contact with solid surfaces. *Colloids Surf.* 557, 94, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.03.016>

Zaobserwowany efekt promieniowania podczerwonego na hydratację, strukturę i samoorganizację białka w roztworze stanowił punkt wyjścia do badań nad wpływem IR na oddziaływanie białka z powierzchniami stałymi.

Adsorpcja białek na powierzchni stałej wpływa zarówno na właściwości powierzchni (np. jej biokompatybilność), jak i funkcjonowanie samego białka. Zdolność zaadsorbowanego białka do zachowania biologicznej aktywności uzależniona jest od charakteru grup odpowiedzialnych za kontakt z powierzchnią, zmian konformacji i jego względnej plastyczności. Cechy te decydują o możliwości specyficznych fluktuacji struktury białka niezbędnych do wypełniania odpowiednich funkcji biologicznych. Adsorpcja białka definiuje również oddziaływanie samej powierzchni z systemami biologicznymi (np. w przypadku implantów). Wynika to z faktu, że warstwa zaadsorbowanych białek jest strefą kontaktu z innymi elementami układu. W przypadku nanocząstek, coraz częściej stosowanych w medycynie, wzajemne oddziaływanie pomiędzy zaadsorbowanymi białkami, tworzącymi tzw.

koronę białkową, reguluje również agregację nanocząstek, a więc ich wypadkowy rozmiar. Ta ostatnia cecha natomiast bezpośrednio wpływa na zdolność cząstek do przekraczania barier biologicznych, np. przenikania do wnętrza komórki. **Celem omawianej pracy było zbadanie wpływu promieniowania podczerwonego na oddziaływanie białka z podłożem stałym oraz z nanocząsteczkami krzemionki.** Do badań wybrano lizozym jaja kurzego - Lys, albuminę surowicy wołowej - BSA oraz albuminę jaja kurzego – OVA. Badane właściwości obejmowały strukturę białka, jego powinowactwo do powierzchni oraz wpływ na agregację cząstek w roztworze. Podstawowe techniki badawcze to: dekonwolucja widma ATR-FTIR, pomiary na mikrowadze kwarcowej z dyssypacją energii (z ang. *Quartz Crystal Microbalance, QCM*) oraz dynamiczne rozpraszanie światła (z ang. *Dynamic Light Scattering, DLS*).

Analiza drugorzędowej struktury białka i jej zmian w wyniku kontaktu z powierzchnią pokazała, że ekspozycja na IR ($\lambda = 2900$ nm) zapobiega rozwijaniu się struktury białka w procesie adsorpcji Lys i BSA i powstrzymuje denaturację niestabilnej helisy typu 3_{10} (rys. 3).



Rys. 3. Zmiany drugorzędowej struktury BSA w wyniku adsorpcji: a) BSA w roztworze; b) denaturacja BSA na powierzchni (rozwijanie helisy α oraz helisy 3_{10} do nieuporządkowanego kłębka statystycznego - *random coil*); c) białko BSA zaadsorbowane na powierzchni po uprzedniej ekspozycji na IR (transformacja helisy α w helisę 3_{10} i zatrzymanie dalszej degradacji struktury).

Ów efekt ochronny nie występuje dla OVA. Zaobserwowane różnice wynikają z charakteru grup funkcyjnych odpowiednich białek. Aminokwasy posiadające dodatnio naładowane grupy funkcyjne, reprezentowane głównie przez lizynę, histydynę i argininę, tworzą najsilniejsze i najtrwalsze wiązania wodorowe z wodą hydratacyjną i to ich obecność na powierzchni białka Lys i BSA decydowała o zdolności IR do stabilizacji jego struktury. Istotna również była lokalizacja tych aminokwasów. Powierzchnia Lys zdominowana jest aminokwasami zasadowymi, które odpowiedzialne są za jej znaczny ładunek dodatni. W przypadku BSA aminokwasy te sąsiadują bezpośrednio z hydrofobowymi fragmentami białka, natomiast w strukturze OVA tym ostatnim towarzyszą ujemnie naładowane (kwasowe) grupy funkcyjne. Domeny hydrofobowe są preferencyjnie „wypychane” z roztworu i adsorbowane na powierzchni, co pociąga za sobą denaturację struktury białka. Obecność w ich pobliżu silnie uwodnionych (po ekspozycji na IR) aminokwasów zasadowych zapobiega dalszemu rozwijaniu struktury białka zainicjowanemu kontaktem części hydrofobowych z powierzchnią stałą. Dodatkowo warto zwrócić uwagę, że arginina, lizyna i histydyna mają najsilniejszy charakter amfifilowy (znaczny udział łańcuchów niepolarnych) spośród wszystkich aminokwasów, a więc powinny wykazywać najsilniejszą tendencję do adsorpcji (segregacji z roztworu). Uwodnienie ich polarnych domen, wzmocnione oddziaływaniem z IR, wydaje się przeciwdziałać temu procesowi.

Pomiary uwodnienia agregatów nanocząstek pokrytych „koroną białkową” oraz powinowactwa białka do powierzchni wykazały, że promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu podczerwieni skutkuje także desorpcją jonów (amfifilowych lub o małej gęstości ładunku) niespecyficznie związanych z niepolarnymi domenami biomakrocząsteczki. Wynikiem tego jest zwiększenie napięcia powierzchniowego na granicy faz białko/woda. Wzrost napięcia powierzchniowego zwiększa natomiast tendencję do adsorpcji lub zwijania struktury białka. Uzyskane wyniki wskazują, że desorpcja jonów z powierzchni białka następuje w wyniku mobilizacji (polaryzacja i ruch w polu elektrycznym) i/lub indukcji w roztworze pęcherzyków gazowych. Pęcherzyki wykazują powinowactwo do powierzchni niepolarnych i zastępują niespecyficznie związane z nimi jony. Mechanizm ten jest zgodny z wynikami uzyskanymi przez Shatalova w serii prac dotyczących wpływu promieniowania elektromagnetycznego na procesy zachodzące w płynach biologicznych.²⁹⁻³¹ Szczególną cechą podczerwieni jest jej zdolność do przekazywania energii cieplnej. Lokalny wzrost temperatury (temperatura całego roztworu była monitorowana i nie ulegała zmianie) zmniejsza rozpuszczalność gazów i może skutkować generacją nanodomen gazowych. Co ciekawe, nanopęcherzyki powietrza są indukowane na powierzchni w przedziale temperatur zbliżonym

do temperatury fizjologicznej, a mianowicie 30 - 45 °C.³⁵ Wynika z tego, że IR może skutkować nie tylko mobilizacją, ale również generowaniem na powierzchniach niepolarnych pęcherzyków gazowych. A oddziaływanie między tymi ostatnimi może być odpowiedzialne za zwijanie białek.³⁶

Podsumowując: na podstawie uzyskanych wyników, możliwe było wykazanie, że promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu podczerwieni może sprzyjać utrzymaniu natywnej struktury białka zarówno dzięki zwiększonemu uwodnieniu polarnych grup funkcyjnych jak i dzięki modyfikacji napięcia powierzchniowego domen niepolarnych sprzyjającej zwijaniu struktury. W przypadku oddziaływania białka z powierzchnią, efekt IR zależy od rodzaju i lokalizacji grup funkcyjnych na powierzchni białka, udziału eksponowanych do wody części hydrofobowych i obecności w roztworze cząstek o powinowactwie do adsorpcji na granicy faz białko/woda.

Badania te wykonane zostały w ramach kierowanego przeze mnie projektu FUGA numer DEC-2015/16/S/ST4/00465 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (Załącznik 4, poz. II.3.1.a (2))

Wpływ podczerwieni na aktywność enzymatyczną białka.

Kowacz M., Warszński P. (2019) Beyond esterase-like activity of serum albumin. Histidine-(nitro)phenol radical formation in conversion cascade of p-nitrophenyl acetate and the role of infrared light. *J Mol Recogn.* e2780, <https://doi.org/10.1002/jmr.2780>

Omówione prace eksperymentalne pokazały, że promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu podczerwieni wpływa zarówno na strukturę białka w roztworze i kontakcie z powierzchnią, jak również na proces wzajemnego oddziaływania cząsteczek białka w roztworze oraz na jakościową i ilościową charakterystykę adsorpcji na powierzchni. **Celem kolejnej pracy było zbadanie, jaki jest wpływ podczerwieni na funkcjonalność białka mierzoną aktywnością enzymatyczną.** W tym celu przeprowadzono badania aktywności enzymatycznej albuminy wołowej (BSA) w reakcji hydrolizy estru p-nitrofenylowego (p-NP) w odpowiedzi na promieniowanie IR o długości fali $\lambda = 2900$ nm. Kinetykę reakcji mierzono poprzez obserwację zmian w czasie absorpcji w zakresie UV-Vis odpowiadającej produktowi reakcji (p-nitrofenolowi). Mechanizm reakcji ustalono na podstawie analizy drugiej pochodnej widma UV-Vis.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wskazanie nowego aspektu aktywności biologicznej najbardziej rozpowszechnionego białka surowicy krwi. Wykazano, że albumina może katalizować nie tylko hydrolizę estru p-nitrofenylowego, ale również dalszą degradację produktu hydrolizy, p-nitrofenolu, z eliminacją grupy NO₂ w formie HNO₂, dalej ulegającego dekompozycji do tlenku azotu (NO). Do tej pory udokumentowane były jedynie dwie możliwe drogi degradacji p-NP, zawsze z udziałem wyspecjalizowanych enzymów. Podobnie tylko działalność wyspecjalizowanych enzymów uznana była za źródło NO, będącego niezwykle istotną cząsteczką sygnalizacyjną. Na podstawie wyników eksperymentalnych ustalono, że degradacja p-NP (po etapie hydrolizy) przez BSA przebiega z wytworzeniem rodnika fenoksyłowego w procesie uzgodnionego przeniesienia protonu i elektronu (z ang. *PCET*, *proton coupled electron transfer*) między pierścieniem imidazolowym histydyny białka BSA a grupą fenolową zhydrolizowanego estru. Każdy etap reakcji: hydroliza estru oraz jego dalsza degradacja wymaga skoordynowanego przeniesienia protonu. Przedstawione dane eksperymentalne wskazują, że właśnie na poziomie przeniesienia protonu ważne jest oddziaływanie z promieniowaniem podczerwonym, które zwiększa wydajność reakcji. Warto zwrócić uwagę, że obserwowane efekty miały charakter nietermalny, ponieważ źródła IR wykorzystane w eksperymentach nie podnosiły temperatury układu.

Wzajemnie skorelowane cząsteczki wody mogą tworzyć swoiste mostki, umożliwiające ukierunkowany transport protonów pomiędzy powierzchnią donora i akceptora.¹³ Ta funkcja wody, mająca źródło w jej organizacji na poziomie molekularnym, jest niezbędnym elementem wydajnego przebiegu reakcji enzymatycznych.^{37,38} W przypadku hydrolizy estru p-NP przez BSA przy przeniesieniu protonu z tyrozyny jako akceptor służy głównie arginina, chociaż zanotowano również udział lizyny i histydyny. Przy dalszej degradacji p-NP w reakcji *PCET* kluczową rolę odgrywa histydyna. Moje poprzednie badania sugerowały, że arginina, lizyna i histydyna to te aminokwasy, których warstwa hydratacyjna ulega rozbudowie w odpowiedzi na promieniowanie IR.³² Oznacza to większe uporządkowanie i współdziałanie tworzących ją cząsteczek wody, a zatem możliwość tworzenia efektywnych mostków wodnych zapewniających ukierunkowane przewodnictwo jonów wodorowych. Mechanizm ten może być odpowiedzialny za wpływ IR na zwiększenie wydajności reakcji. Dodatkowe analizy potwierdziły również, że eliminacja pęcherzyków gazowych w wyniku oddziaływania z IR także przyczynia się do obserwowanego efektu IR na przebieg reakcji. Eliminacja przeszkód strukturalnych w postaci inkluzji gazowych umożliwia bowiem efektywniejszą wzajemną korelację cząsteczek wody. Wyniki te znajdują potwierdzenie w innych badaniach

wskazujących na wzrost przewodnictwa i lepkości wody po usunięciu domen gazowych wskutek oddziaływania niejonizującego promieniowania elektromagnetycznego.³¹

Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną rolę IR (endogennego – ciepło metaboliczne, indukcja przy powierzchniach lub egzogennego – promieniowanie słoneczne) w reakcjach enzymatycznych i procesach opartych na uzgodnionym przeniesieniu protonu i elektronu (*proton coupled electron transfer, PCET*). *PCET* ma istotne znaczenie biologiczne. Odpowiada między innymi za transport elektronów podczas fotosyntezy i syntezy DNA. Transport elektronów jest natomiast podstawą konwersji energii w komórce. Większość procesów biochemicznych wewnątrz organizmu zachodzi tylko przy zachowaniu odpowiedniej temperatury. Temperatura na poziomie molekularnym wynika z drgań wiązań w cząsteczkach, a drgania te są źródłem promieniowania w podczerwieni. Wyniki prezentowanych badań wskazują, że drgania oscylacyjne cząsteczek wody wzbudzone przez IR niosą za sobą strukturalne efekty dla organizacji wody hydratacyjnej. Uporządkowana woda hydratacyjna wpływa natomiast na przebieg reakcji z udziałem uwodnionej powierzchni.

Wyniki badań nad wpływem podczerwieni na strukturę i funkcję białek zostały zaprezentowane m.in. na trzech wykładach na zaproszenie na międzynarodowych konferencjach: *12th Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water 2017*, *7th Visegrad Symposium on Structural Systems Biology 2017* oraz *11th Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water 2016* (Zał. 4, poz. II.2.1.a (1), (2), (3))

Wpływ podczerwieni i dwutlenku węgla na ładunek domen hydrofobowych

Kowacz M, Pollack G. (2019) Moving water droplets: The role of atmospheric CO₂ and incident radiant energy in charge separation at the air-water interface. *J. Phys. Chem. B*, 123, 51, 11003, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b09161>

Niezwykle ważnym aspektem odpowiedzialnym za zwijanie białka, jego tendencję do niespecyficznego agregacji czy adsorpcji na powierzchni jest charakterystyka kontaktu domen hydrofobowych z wodą. Ze względu na złożoność układów biologicznych jako model tego kontaktu wykorzystuje się w badaniach granicę faz woda/powietrze, o której wiadomo, że posiada ujemny ładunek elektryczny^{16,17} Pomimo wielu badań dotyczących pochodzenia ujemnego ładunku w strefie kontaktu woda/powietrze (powierzchnia hydrofobowa) jest to kwestia wciąż nie do końca rozstrzygnięta. **Celem omawianej pracy było eksperymentalne**

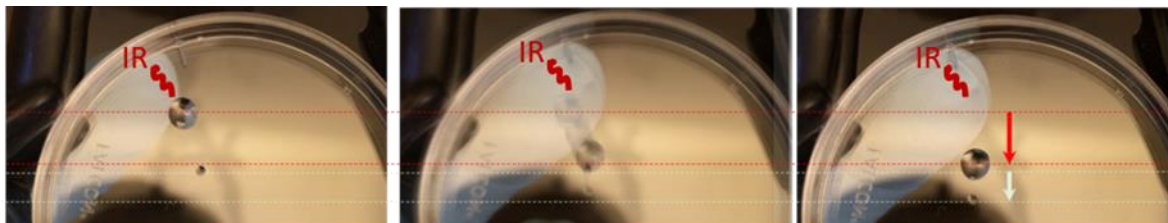
potwierdzenie sugerowanej w innych badaniach naukowych³⁹⁻⁴⁰ roli CO₂ w generowaniu ujemnego ładunku powierzchniowego. Ze względu na wyniki symulacji komputerowych wskazujące na polaryzację cząsteczek wody jako źródło ujemnego ładunku⁴¹, **celem pracy było także zbadanie wpływu podczerwieni, jako czynnika sprzyjającego organizacji cząsteczek wody, na generowanie ładunku.**

Modelem eksperymentalnym były krople wody charakteryzujące się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości. Badania spektroskopowe w podczerwieni (ATR-FTIR) na granicy faz woda/powietrze/ciało stałe ujawniły akumulację jonów wodorowęglanowych (HCO₃⁻) w strefie międzyfazowej. Jony te pochodzą z rozpuszczania atmosferycznego CO₂ (CO₂ + H₂O → HCO₃⁻ + H⁺). Warto podkreślić, że wyniki te stanowią pierwsze dane eksperymentalne pozwalające na identyfikację jonów HCO₃⁻ w strefie kontaktu woda/powietrze. Udokumentowany w dotychczasowych badaniach wypadkowy ładunek elektryczny na powierzchni wody^{16,17} wymaga efektywnego rozdziału ładunków. W przeciwnym razie aniony byłyby neutralizowane przez towarzyszące im kationy. Rozdział ładunków jest możliwy dzięki różnicy w szybkości dyfuzji protonów (H⁺) i jonów wodorowęglanowych (HCO₃⁻). Podczas gdy protony szybko przemieszczają się od powierzchni do roztworu, jony wodorowęglanowe podążają za nimi znacznie wolniej. Poza różnym tempem dyfuzji, te ostatnie wykazują także pewne powinowactwo do powierzchni i tendencję do separacji z roztworu wodnego, ponieważ tworzenie wiązań wodorowych przez ich grupy hydroksylowe jest stosunkowo niekorzystne energetycznie. Szybka dyfuzja protonów w wodzie możliwa jest dzięki swoistemu przewodnictwu po skoordynowanych łańcuchach wodnych (tzw. mechanizm Grotthusa).⁹ Jak wykazały poprzednie badania, prezentowane w ramach omawianego cyklu, ta wzajemna organizacja cząsteczek wody może być stymulowana przez promieniowanie z zakresu podczerwieni. Wyniki eksperymentów z kroplami wody są zgodne z obserwacją, że IR sprzyja mobilności protonów, a zatem rozdziałowi ładunków, co skutkuje zwiększonym ujemnym ładunkiem powierzchniowym.

Warto zauważyć, że specyficzna absorpcja w podczerwieni (przy 1638 cm⁻¹), która pozwoliła na identyfikację jonów wodorowęglanowych, wynika z obecności w ich strukturze grup OH. Jest to zarazem ta część spektrum, w której absorbują cząsteczki samej wody. Zwiększona polaryzacja cząsteczek wody (w wyniku wzajemnych oddziaływań) może również skutkować zwiększoną absorpcją w tej części widma i świadczyć o specyficznym uporządkowaniu cząsteczek wody powierzchniowej. Wyniki te są zgodnie z rezultatami symulacji komputerowych sugerujących, że polaryzacja cząsteczek może być źródłem ładunku na granicy faz woda/powietrze.⁴¹ Wpływ IR na ładunek powierzchniowy, na który wskazują

uzyskane w prezentowanej pracy dane eksperymentalne, może zatem wynikać również ze zdolności IR do stymulowania samoorganizacji cząsteczek wody powierzchniowej.

Modulacja ładunku powierzchniowego wody, dzięki oddziaływaniu IR, umożliwiła stworzenie układu reagującego na bodźce. Wyraziło się to w postaci ruchu kropli wody, odpychanej lub przyciąganej przez źródło IR, w zależności od ładunku podłoża (rys 4).



Rys. 4 Krople wody spontanicznie przemieszczające się w kierunku od źródła IR. Czerwona (biała) strzałka wskazuje wypadkowe przemieszczenie odpowiednio większej (mniejszej) kropli.

Warto podkreślić, że emiterami IR wzbudzającymi odpowiedź układu były obiekty hydrofilowe, takie jak opuszek palca, drewno, korek czy szkło. Natomiast obiekty hydrofobowe jak Teflon czy styropian nie wzbudzały ruchu kropli. Wynika to z faktu, że te ostatnie wykazują się bardzo słabą emisją w podczerwieni, co wyraża się także w ich niskim przewodnictwie cieplnym.

Dla uzyskania reakcji na bodźce w omawianym układzie niezbędna była obecność CO₂. Stwierdzono to na podstawie eksperymentów kontrolnych przeprowadzonych w atmosferze gazu obojętnego. Ma to potencjalnie bardzo istotne przełożenie na układy biologiczne, gdzie CO₂ jest produkowany np. w procesie oddychania komórkowego. Ze względu na różnice w dyfuzyjności i powinowactwie do powierzchni jonów wodorowęglanowych i uwodnionych protonów rozpuszczanie CO₂ może modulować ładunek elektryczny powierzchni. Ponadto podczerwień, jako ciepło metaboliczne lub energia pochłaniana ze środowiska, może dodatkowo wpływać na zależność ładunku od jonów uwalnianych do systemu. Możliwy jest zatem scenariusz, gdzie w odpowiedzi na aktywność metaboliczną następuje regulacja efektywnego ładunku powierzchni białka i jego oddziaływania z roztworem wodnym.

Badania te zostały przeprowadzone podczas mojej pracy na Wydziale Bioinżynierii Uniwersytetu Waszyngtońskiego, gdzie przez okres 2 lat pełniłam funkcję *Visiting Assistant Professor*.

Woda hydratacyjna a rozdział ładunków przez membranę hydrożelową.

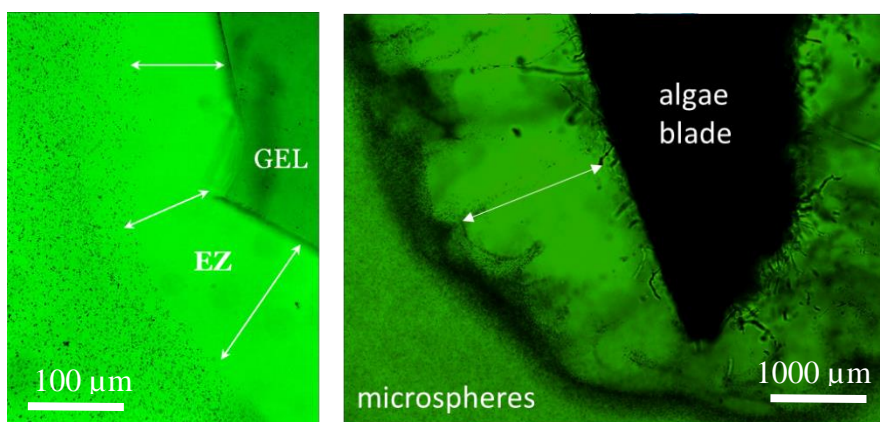
Kowacz M, Pollack G. (2020) Cells in New Light: Ion Concentration, Voltage, and Pressure Gradients across a Hydrogel Membrane. *ACS Omega*, 5, 21024, <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02595>

Rozdział ładunków, omawiamy w poprzedniej pracy dla granicy faz woda/powierze, generuje napięcie elektryczne, a to stanowi potencjalne źródło energii. Jedną z podstawowych cech wszystkich zdrowych komórek jest właśnie zdolność do wytwarzania różnicy potencjałów (napięcia) pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnątrzkomórkowym.²¹ Rozdział ładunków sprzyja również stabilizacji organizacji dipoli wody w polu elektrycznym.¹⁴ **Celem przedstawianej pracy było zbadanie (i) mechanizmu tworzenia napięcia elektrycznego w układzie symulującym strefę kontaktu wnętrza komórki z otaczającym ją roztworem oraz (ii) określenie wpływu tego zjawiska na charakterystykę wody hydratacyjnej.**

W badaniach wykorzystano układ, w którym roztwory KCl i NaCl, reprezentujące główne składniki jonowe cytosolu i przestrzeni zewnątrzkomórkowej, oddzielone zostały od siebie membraną hydrożelową w postaci alginianu wapnia. Dokonano pomiarów napięcia elektrycznego przez membranę i zmian przewodnictwa jonowego roztworów po obu jej stronach (dyfuzja jonów przez membranę) oraz obserwacji wpływu ciśnienia osmotycznego i hydrostatycznego na przepływ (adwekcję) wody przez membranę. Przeprowadzono również analizę selektywności jonowej żelu stanowiącego membranę (na podstawie spektrum w podczerwieni) oraz obserwacje mikroskopowe warstwy hydratacyjnej alginianu wapnia oraz plechy glonu morskiego, którego głównym składnikiem strukturalnym jest alginian wapnia.

W komórce barierę między cytosolem a środowiskiem wewnątrzkomórkowym stanowi błona lipidowa. Niemniej jednak istnieją dane eksperymentalne świadczące o tym, że właściwości elektryczne komórki są zachowane nawet w przypadku, kiedy utracona jest ciągłość błony komórkowej.⁴² Natomiast nienaruszona błona z aktywnymi pompami, lecz bez cytoplazmy nie może transportować jonów w kierunku przeciwnym do różnicy stężeń.⁴³⁻⁴⁵ Ostatnie badania pokazały także, że sam cytoszkielet komórkowy może generować napięcie elektryczne bez udziału pomp i kanałów obecnych jedynie w błonie komórkowej.^{46,47} Dla omawianych eksperymentów wybrano membranę hydrożelową ze względu na fakt, że może ona stanowić model cytoszkieletu czy ściany komórkowej (w przypadku roślin), które podobnie jak cytoszkielet, mają charakter żelu.

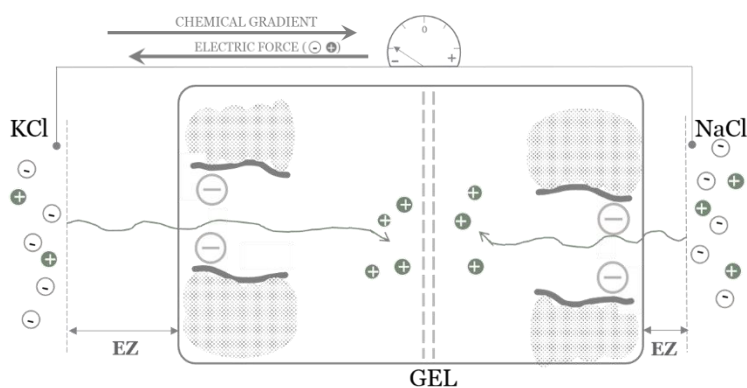
Uzyskane wyniki pokazały, że membrana hydrożelowa może utrzymywać różnicę stężeń jonów pomiędzy roztworami po obu jej stronach. Wyraziło się to brakiem zmian przewodnictwa roztworów świadczącym o braku dyfuzji jonów przez membranę. Ponadto zarejestrowano różnicę potencjałów elektrycznych wskazującą, że roztwór KCl zyskał ujemny ładunek elektryczny w stosunku do roztworu NaCl po drugiej stronie membrany. W układzie tym udało się więc odtworzyć pewne cechy swoiste żywym komórkom (napiecie elektryczne i różnica stężeń jonów) bez nakładu energii niezbędnej do funkcjonowania pomp i kanałów jonowych. Poza tym membrana hydrożelowa mimo znacznej porowatości okazała się również utrzymywać różnicę ciśnień osmotycznego i hydrostatycznego między roztworami. Zostało to stwierdzone na podstawie braku przepływu wody pomiędzy roztworami (o różnej sile jonowej lub różnej wysokości słupa cieczy) oddzielonymi membraną. Wyniki te mogą mieć przełożenie na mechanizm regulacji osmotycznej komórki. Analiza właściwości oraz obserwacja mikroskopowa żelu pozwoliła na identyfikację warstwy hydratacyjnej efektywnie wykluczającej jony i cząstki zawieszone (zwanej z ang. *Exclusion Zone*, EZ) na odległość kilkuset mikrometrów od powierzchni. Podobną warstwę hydratacyjną zaobserwowano dla plechy glonu morskiego (rys. 5).



Rys 5. Obraz mikroskopowy pokazujący warstwę wody powierzchniowej (EZ) wolnej od jonów i cząstek zawieszonych dla alginianu wapnia (lewy panel) i plechy glonu morskiego (prawy panel).

W oparciu o uzyskane dane możliwe było zaproponowanie mechanizmu odpowiedzialnego za zdolność hydrożelu do utrzymywania gradientu stężeń, ciśnienia i napięcia elektrycznego. U podłoża tego zjawiska leży selektywna przepuszczalność żelu wobec jonów o określonym znaku. Ujemnie naładowane grupy funkcyjne porów żelu pozwalają jedynie kationom, ale nie anionom, na przenikanie w głąb struktury. Ze względu na fakt, że jony K^+ mają szybsze tempo dyfuzji oraz mniejsze powinowactwo do wiązania się z grupami

funkcyjnymi żelu niż jony Na^+ , penetrują one membranę z większą efektywnością. Pozostawia to w roztworze niezrównoważone aniony i skutkuje ujemnym potencjałem elektrycznym w stosunku do roztworu NaCl (o mniejszej efektywności rozdziału ładunków) po drugiej stronie membrany. Gdy kationy dyfundują w pory membrany, roztwór w kontakcie z membraną po obu jej stronach zyskuje wypadkowy ładunek ujemny. To z kolei generuje siłę elektryczną przyciągającą kationy z powrotem do roztworu i przeciwdziałającą sile gradientu chemicznego. W ten sposób utrzymywana jest równowaga i stabilna różnica potencjałów (rys. 6). Układ taki jest stabilny i nie wymaga nakładów energii, ponieważ opisana równowaga sił istnieje po obu stronach membrany, zarówno dla jonów Na^+ jak i K^+ . Jest to możliwe dzięki znaczącej na poziomie molekularnym objętości membrany, która może akumulować jony wewnątrz swojej struktury. W klasycznym rozumieniu, gdzie barierą jest *dwuwarstwa* lipidowa o hydrofobowym wnętrzu, jony przedostają się przez specyficzne, uwodnione kanały na jej drugą stronę. Szybsze tempo dyfuzji K^+ (kationu o największym stężeniu wewnątrz komórki) oznacza, że wewnątrz komórki zyskuje wypadkowy ładunek ujemny w stosunku do środowiska zewnątrzkomórkowego (zdominowanego przez jony Na^+), a nie na granicy faz roztwór/membrana. W związku z tym siła elektryczna działa w kierunku do wnętrza komórki zarówno na jony K^+ jak i Na^+ . W przypadku Na^+ zarówno gradient chemiczny jak i różnica potencjałów elektrycznych stymulują więc przepływ jonów do cytosolu. Pompy jonowe muszą zatem aktywnie transportować Na^+ z komórki przy wykorzystaniu energii.



Rys 6. Schematyczna ilustracja mechanizmu powstawania różnicy potencjałów elektrycznych przy powierzchni hydrożelu

Kolejną konsekwencją selektywności membrany żelowej w stosunku do jonów o dodatnim znaku, jest istnienie warstwy wody powierzchniowej wolnej od jonów i o strukturze uporządkowanej w polu elektrycznym (rys.5). Wynika to z faktu, że gdy kationy dyfundują w głąb membrany, pozostałe w roztworze aniony są odpychane przez ujemnie naładowane grupy

funkcyjne żelu. W konsekwencji woda w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią bariery żelowej staje się wolna od jonów i wszelkich cząstek zawieszonych. Dlatego zyskała ona nazwę strefy wykluczenia (z ang. *Exclusion Zone, EZ*) (rys. 5). Dipole wody są w niej uporządkowane w polu elektrycznym utworzonym przez rozdział ładunków. Uzyskane w omawianej pracy wyniki eksperymentalne, potwierdzają dane z symulacji komputerowych,⁴⁸ które sugerują, że woda taka ma strukturę przypominającą strukturę ciekłego kryształu, a to czyni ją mniej podatną na działanie ciśnienia. Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami wody, wzmocnione w polu elektrycznym, przeciwdziałają odkształceniom struktury takiego ciekłego kryształu. Dzięki temu membrana żelowa, pomimo dużej średnicy porów, stanowi skuteczną barierę uniemożliwiającą przepływ wody pod naciskiem ciśnienia osmotycznego czy hydrostatycznego. Ma to potencjalnie niezwykle istotne znaczenie dla utrzymania stałej objętości komórki.

Przedstawione wyniki sugerują, że podstawowe właściwości elektrochemiczne komórki (t.j. potencjał elektryczny, różnica stężeń jonów czy uwodnienie wnętrza) prawdopodobnie mogą być zachowane bez znacznego wydatkowania energii metabolicznej. W oparciu o uzyskane wyniki sformułowana została hipoteza badawcza stanowiąca podstawę kierowanego przeze mnie obecnie projektu pt. „*Napięcie membrany hydrożelowej. Nowe spojrzenie na potencjał błonowy komórki i jego znaczenie dla wczesnego rozwoju zarodka*” finansowanego ze środków NCN w ramach grantu Sonata Bis (Zał. 4, poz. II.3.1.a (1)).

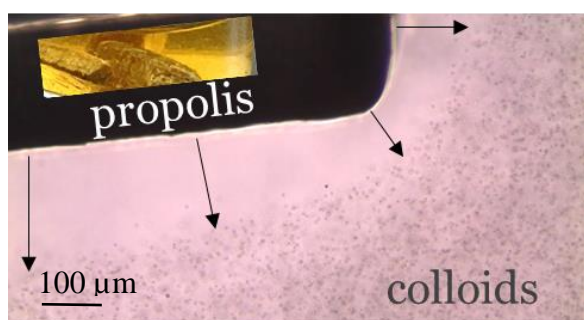
Woda hydratacyjna jako strefa wykluczenia. Wpływ fizykochemii powierzchni.

Kowacz M, Pollack G. (2020) Propolis-induced exclusion of colloids: Possible new mechanism of biological action. *Colloid Interface Sci. Comm.* 38, 100307, <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100307>

Istnienie warstwy wody powierzchniowej efektywnie wykluczającej jony oraz cząstki zawieszone – *EZ (Exclusion Zone)*, zostało potwierdzone w wielu badaniach eksperymentalnych.⁴⁹⁻⁵¹ Jej potencjalne znaczenie rozciąga się od procesów technologicznych, np. odsalania wody⁵², poprzez tworzenie powierzchni odpornych na adhezję patogenów⁵³ po procesy biologiczne, gdzie *EZ* można porównać z warstwą wody tzw. niemieszalnej towarzyszącej każdej komórce.⁵¹ Wiele substancji pochodzenia naturalnego, np. kurkuma, olej kokosowy czy masło klarowane, stymuluje powstawanie warstwy *EZ*.⁵⁴ **Celem mojej pracy**

było zbadanie zdolności propolisu do generowania *EZ*. Jako motywacja posłużyły doniesienia na temat efektywności propolisu we wspieraniu leczenia choroby COVID-19 wywołanej wirusem SARS-CoV-2 oraz szeroko rozpoznane właściwości propolisu w zapobieganiu i leczeniu infekcji górnych dróg oddechowych, w tym wywołanych przez koronawirusy.⁵⁵ W badaniach wykorzystano etanolowy ekstrakt propolisu (EEP). Pozwala on na uwolnienie do roztworu znacznej ilości biologicznie aktywnych składników propolisu i jest najczęstszą formą propolisu stosowaną w badaniach naukowych oraz preparatach aptecznych. EEP zaadsorbowano na powierzchniach szklanych i przeprowadzono obserwacje mikroskopowe warstwy hydratacyjnej.

Wyniki badań wskazują na zdolność składników EEP do tworzenia warstwy *EZ* skutecznie wykluczającej modelowe cząstki zawieszone na odległość kilkuset mikrometrów od powierzchni (rys. 7). Obserwacje te pozwoliły na zaproponowanie nowego mechanizmu, który może przyczyniać się do antywirusowych i antybakteryjnych właściwości propolisu. W przeciwieństwie do szeroko dyskutowanych procesów biochemicznych, za które odpowiedzialne są poszczególne komponenty chemiczne propolisu, zaproponowany proces działa na zasadzie tworzenia fizycznej bariery w postaci uporządkowanej struktury wody powierzchniowej, która nie pozwala na kontakt patogenu z powierzchnią. Może to stanowić pierwszą linię obrony przed czynnikami chorobotwórczymi takimi jak wirusy czy bakterie będące z fizykochemicznego punktu widzenia cząstkami koloidalnymi.



Rys. 7. Powierzchnia pokryta ekstraktem propolisu efektywnie wyklucza cząstki zawieszone.

Za tworzenie *EZ* przy powierzchni pokrytej składnikami propolisu odpowiedzialny jest rozdział ładunków elektrycznych spowodowany szybką dyfuzją mobilnych jonów wodorowych pochodzących z dysocjacji grup funkcyjnych propolisu. Protony dyfundują do roztworu w celu wyrównania różnicy stężeń pozostawiając ujemnie naładowane grupy funkcyjne związane z powierzchnią. W efekcie generowany jest efektywny rozdział ładunków i uporządkowanie dipoli wody w polu elektrycznym. Zjawisko to jest niestabilne i po około dwóch godzinach następuje osiągnięcie stanu równowagi, wyrównanie stężeń w roztworze i zanik warstwy *EZ*.

Stabilizacja strefy *EZ* możliwa jest dzięki stałej wymianie materii i energii ze środowiskiem (np. rozpuszczanie CO_2 na granicy faz woda/powietrze)¹⁸ lub stworzeniu układu, w którym przyciąganie ładunków równoważone jest inną siłą, np. gradientu chemicznego (np. selektywna membrana pomiędzy roztworami o różnym stężeniu czy składzie chemicznym).⁵¹ W przypadku powinowactwa składników propolisu do śluzówki wyściełającej górne drogi oddechowe, uzasadnionym jest oczekiwanie, że działanie propolisu oparte na indukowaniu *EZ* może zostać przedłużone. Jest to prawdopodobne ze względu na właściwości śluzówki stanowiącej porowatą warstwę o charakterze żelu mogącą akumulować jony wewnątrz struktury i tym samym stabilizować rozdział ładunków.

Badania te przeprowadzone zostały w odpowiedzi na zaistniałą potrzebę zwiększenia wiedzy na temat możliwych środków profilaktycznych lub wspomagających leczenie w przypadku zakażenia nowym koronawirusem odpowiedzialnym za pandemię COVID 19. Artykuł, w którym przedstawiono wyniki tych badań jest jednym z 8 w kategorii najbardziej popularnych artykułów z ostatnich trzech lat publikowanych w czasopiśmie *Colloid and Interface Science Communications*.

4.6. Podsumowanie

Badania przedstawione w publikacjach wchodzących w skład niniejszego osiągnięcia naukowego przyczyniły się do rozpoznania wzajemnego oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego, powierzchni i wody hydratacyjnej oraz wpływu tego oddziaływania na funkcje struktur/układów o znaczeniu biologicznym.

Badania te pozwoliły na ustalenie wpływu niejonizującego promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (IR) na konformację i funkcje białek:

- IR zwiększa uwodnienie polarnych grup funkcyjnych i dzięki temu chroni cząsteczki białka przed procesem niespecyficznego agregacji w roztworze i denaturacją struktury białka w kontakcie z powierzchnią;
- dzięki oddziaływaniu z pęcherzykami gazowymi (mobilizacja, nukleacja) w roztworze IR może modyfikować napięcie powierzchniowe na styku domen hydrofobowych ze środowiskiem wodnym i promować natywną konformację (zwijanie) białka;
- IR wpływa na zwiększenie współoddziaływania dipoli wody przy powierzchni biomakrocząsteczek, dzięki czemu wspiera ukierunkowany transport protonów stanowiący podstawę wielu procesów enzymatycznych;

- poprzez wpływ na przewodnictwo uwodnionych protonów, IR promuje efektywną separację jonów pochodzących z rozpuszczania CO₂ na granicy faz woda/powietrze, co skutkuje ujemnym ładunkiem powierzchniowym. Sugeruje to, że CO₂ i ciepło metaboliczne (IR) mogą potencjalnie modulować ładunek powierzchni hydrofobowych (np. białka), a zatem definiować ich powinowactwo do wody.

Ponadto omówione badania pozwoliły na ustalenie zależności między określonymi cechami fizykochemicznymi powierzchni, polem elektrycznym i wodą hydratacyjną:

- powierzchnia hydrożelu o porach posiadających jednoimiennie naładowane grupy funkcyjne (symulująca pewne właściwości cytoszkieletu czy ściany komórkowej) może prowadzić do segregacji jonów w roztworze i stabilnej różnicy potencjałów elektrycznych;
- różnica w dyfuzyjności jonów pochodzących z dysocjacji grup funkcyjnych (np. substancji biologicznie aktywnych) może powodować lokalny, przejściowy rozdział ładunków (napiecie elektryczne);
- napięcie elektryczne generowane przez rozdział ładunków przy powierzchni sprzyja tworzeniu uporządkowanej warstwy wody hydratacyjnej, która efektywnie wyklucza jony oraz cząstki zawieszone i może wykazywać właściwości ciekłego kryształu. Jest to woda o właściwościach zbliżonych do tzw. wody niemieszalnej (*unstirred water layer*) towarzyszącej komórkom.

Powyższe wyniki pozwoliły między innymi na sformułowanie hipotezy badawczej leżącej u podstaw kierowanego przeze mnie obecnie projektu Sonata Bis, w którym zajmę się badaniem zależności pomiędzy potencjałem elektrycznym komórki, jej wodą powierzchniową i czynnikami środowiskowymi takimi jak dwutlenek węgla i promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu podczerwieni. Potencjał błonowy komórki koreluje między innymi z jej tendencją do proliferacji, szczególnie wyrażoną na wczesnym etapie rozwoju zarodka czy też w komórkach rakowych. W projekcie skupimy się na procesie embriogenezy. Pozwoli to na przeniesienie moich badań z poziomu molekularnego na poziom komórki i zweryfikowanie jak rozpoznane wcześniej zależności odzwierciedlają się na procesach i funkcjach biologicznych na wyższym poziomie organizacji.

4.7. Bibliografia

1. Yoo H, Nagornyak E, Das R, Wexler AD, Pollack GH. (2014) Contraction-induced changes in hydrogen bonding of muscle hydration water. *J. Phys. Chem. Lett.* 5, 947.
2. Combet S, Zanotti J-M. (2012) Further evidence that interfacial water is the main “driving force” of protein dynamics: a neutron scattering study on perdeuterated C-phycocyanin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 4927.
3. Schiro G, Fichou Y, Gallat F-X, Wood K, Gabel F, Moulin M, Hartlein M, Heyden M, Colletier J-P, Orecchini A, Paciaroni A, Wuttke J, Tobias DJ, Weik M. (2015) Translational diffusion of hydration water correlates with functional motions in folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Commun.* 6, 6490.
4. Chaplin M. (2006) Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 861.
5. Jaeken L, Vasilievich Matveev V. (2012) Coherent Behavior and the Bound State of Water and K(+) Imply Another Model of Bioenergetics: Negative Entropy Instead of High-energy Bonds. *Open Biochem J*, 6, 139-159.
6. Harano Y, Kinoshita M. (2005) Translational-entropy gain of solvent upon protein folding. *Biophys J.* 89, 2701.
7. Disalvo EA, Lairion F, Martini F, Tymczyszyn E, Frías M, Almaleck H, Gordillo GJ. (2008) Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 2655–2670.
8. Hassanali A, Giberti F, Cuny J, Kühne TD, Parrinello M. (2013) Proton transfer through the water gossamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 13723.
9. Garczarek F, Gerwert K. (2006) Functional waters in intraprotein proton transfer monitored by FTIR difference spectroscopy. *Nature* 439, 109.
10. Ceriotti M, Cuny J, Parrinello M, Manolopoulos DE. (2013) Nuclear quantum effects and hydrogen bond fluctuations in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 15591.
11. Geissler PL, Dellago C, Chandler D, Hutter J, Parrinello M. (2001) Autoionization in Liquid Water. *Science* 291, 2121.
12. Ron I, Pecht I, Sheves M, Cahen D. (2010) Proteins as Solid-State Electronic Conductors. *Acc. Chem. Res.* 43, 945
13. Ahmad M, Gu W, Geyer T, Helms V. (2011) Adhesive water networks facilitate binding of protein interfaces. *Nature Commun.* 2, 261
14. **Kowacz M**, Mukhopadhyay A, Carvalho AL, Esperanca JMSS, Romao MJ, Rebelo LPN. (2012) Hofmeister effects of ionic liquids in protein crystallization: Water-mediated and direct interactions. *CrystEngComm.* 14, 4912-4921
15. Šarić A, Chebaro YC, Knowles TP, Frenkel D. (2014) Crucial role of nonspecific interactions in amyloid nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 111, 17869-17874.
16. Poli E, Jong KH, Hassanali A. (2020) Charge transfer as a ubiquitous mechanism in determining the negative charge at hydrophobic interfaces. *Nat Commun* 11, 901
17. Paluch M. (2015) Surface potential at the water-air interface. *Annales UMCS Lublin-Polonia*, LXX, 2, AA, DOI: 10.1515/umcschem-2015-0013
18. **Kowacz M**, Pollack G. (2019) Moving water droplets: The role of atmospheric CO₂ and incident radiant energy in charge separation at the air-water interface. *J. Phys. Chem. B*, 123, 51, 11003.
19. Sharma M, Resta R, Car R. (2007) Dipolar correlations and the dielectric permittivity of water. *Phys. Rev. Lett.* 98, 247401

20. Martin DR, Matyushov DV. (2015) Dipolar nanodomains in protein hydration shells. *J. Phys. Chem. Lett.* 2015, 6, 3, 407–412
21. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4th ed.; Freeman, W. H.: New York, 2000. Section 15.4, Intracellular ion environment and membrane electric potential. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21627/>.
22. Barlow NE, Bolognesi G, Haylock S, Flemming AJ., Brooks NJ, Barter LMC, Ces O. (2017) Rheological Droplet Interface Bilayers (rheo-DIBs): Probing the unstirred water layer effect on membrane permeability via spinning disk induced shear stress. *Sci Rep* 7, 17551
23. Reines BP, Ninham BW. (2019) Structure and function of the endothelial surface layer: unraveling the nanoarchitecture of biological surfaces. *Q Rev Biophys.* 52, e13.
24. Firth JA. (2002) Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J Anat.* 200, 541-8.
25. Derjaguin BV, Golovanov MV. (1984) On long-range forces of repulsion between biological cells. *Colloids Surf.* 10, 77–84.
26. Pokorný J., Pokorný J., Kobilková J. (2013) Postulates on electromagnetic activity in biological systems and cancer. *Integr. Biol.* 5, 1439-1446
27. Zheng J, Chin W-C, Khijniak E, Khijniak E Jr, Pollack GH. (2006) Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 127, 19-2
28. Matyushov DV. (2014) Electrophoretic mobility without charge driven by polarisation of the nanoparticle–water interface. *Mol.Phys.* 112, 2029–2039.
29. Shatalov VM. (2012) Mechanism of the biological impact of weak electromagnetic fields and the in vitro effects of blood degassing. *Biophysics* 57, 808-813.
30. Shatalov VM, Filippov AE, Noga IV. (2012) Bubbles induced fluctuations of some properties of aqueous solutions. *Biophysics* 57, 421-427.
31. Shatalov VM, Noga IV, Zinchenko A. (2010) Degassing of bioliquids in low electromagnetic fields. *Electr. J. Biol.* 6, 67-72.
32. **Kowacz M.**, Warszyński P. (2018) Effect of infrared light on protein behaviour in contact with solid surfaces. *Colloids Surf.*, 557, 94.
33. Vatansever F, Hamblin MR. (2012) Far infrared radiation (FIR): its biological effects and medical applications. *Photonics Lasers Med.* 1, 255-266.
34. Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR. (2016) Infrared and skin: friend or foe. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 155, 78-85
35. Sen S, Voorheis HP. (2014) *J. Theoretical Biology* 363, 169
36. Seddon JRT, Kooij ES, Poelsema B, Zandvliet HJW, Lohse D. (2011) Surface bubble nucleation stability. *Phys. Rev. Lett.* 106, 056101
37. Bjerregaard-Andersen K, Sommer T, Jensen J, Jochimsen B, Etzerodt M, Morth J. (2014) A proton wire and water channel revealed in the crystal structure of isatin hydrolase. *J Biol Chem.* 289, 21351-21359.
38. Grigorenko B, Knyazeva M, Nemukhin A. (2016) Analysis of proton wires in the enzyme active site suggests a mechanism of c-di-GMP hydrolysis by the EAL domain phosphodiesterases. *Proteins Struct Funct Bioinf.* 84, 1670-1680.
39. Yan X, Delgado M, Aubry J, Gribelin O, Stocco A, Boisson-Da Cruz F, Bernard J, Ganachaud F. (2017) Central Role of Bicarbonate Anions in Charging Water/Hydrophobic Interfaces. *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 96–103.
40. Yan X, Stocco A, Bernard J, Ganachaud F. (2018) Freeze/Thaw-Induced Carbon Dioxide Trapping Promotes Emulsification of Oil in Water. *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 5998–6002.

41. Vačha R, Marsalek O, Willard AP.; Bonthuis, D. J.; Netz, R.R.; Jungwirth, P. (2011) Charge transfer between water molecules as the possible origin of the observed charging at the surface of pure water. *J. Phys. Chem. Lett.* 3, 107–111.
42. Ling G. (1978) Maintenance of low sodium and high potassium levels in resting muscle cells. *J. Physiology*, 280, 105-123.
43. Ung G, Negendank W. (1980) Do isolated membranes and purified vesicles pump sodium?: A critical review and reinterpretation. *Perspectives Biol. Med.* 23, 215-239.
44. Edelmann L, (2001) Basic biological research with the striated muscle by using cryotechniques and electron microscopy. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 33, 209-213.
45. Edelmann L. (2005) Doubts about the sodium-potassium pump are not permissible in modern bioscience. *Cell. Mol. Biol.* 51,725-729.
46. Cantero M, Villa Etchegoyen C, Perez P, Scarinci N, Cantiello H. (2018) Bundles of Brain Microtubules Generate Electrical Oscillations. *Sci. Reports* 8, 11899.
47. Frieden B, Gatenby R. (2019) Signal transmission through elements of the cytoskeleton form an optimized information network in eukaryotic cells. *Sci. Reports* 9, 6110.
48. Ritos K, Borg MK, Mottram NJ, Reese JM. (2016) Electric fields can control the transport of water in carbon nanotubes. *Philos. Trans. R. Soc., A*, 374, 20150025.
49. Li Z, Pollack G. (2020) Surface-induced flow: A natural microscopic engine using infrared energy as fuel. *Sci. Adv.* 6 10.1126/sciadv.aba0941
50. Zheng J, Pollack G. (2003) Long-range forces extending from polymer-gel surfaces. *Phys. Rev. E.* 68, 031408.
51. **Kowacz M**, Pollack G. (2020) The Cell in New Light: Ion Concentration, Voltage, and Pressure Gradients Across a Hydrogel Membrane. *ACS Omega* 5, 21024.
52. Park S, Jung Y, Son S, Cho I, Cho Y, Lee H, Kim H, Kim S. (2016) Capillarity Ion Concentration Polarization as Spontaneous Desalting Mechanism. *Nat. Commun.* 7, 11223.
53. Cheng Y, Moraru C. (2018) Long-range interactions keep bacterial cells from liquid-solid interfaces: evidence of a bacteria exclusion zone near Nafion surfaces and possible implications for bacterial attachment. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 162, 16-24.
54. Sharma A, Pollack G. (2020) Healthy fats and exclusion-zone size. *Food Chem.* 316, 126305.
55. Zuhendri F, Chandrasekaran K, **Kowacz M**, Ravalía M, Kripal K, Fearnley J, Perera CO. (2021) Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: a review. *Foods* 10, 1360.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

W trakcie swojej pracy naukowej wykazywałam się istotną aktywnością naukową w następujących jednostkach:

1. Uniwersytet Gdański
2. University of Aveiro, Aveiro, *Portugalia*
3. University of Münster, Münster, *Niemcy*
4. University of Oviedo, Oviedo, *Hiszpania*
5. ITQB - Institute of Chemical and Biological Technology António Xavier (New University of Lisbon), Oeiras, *Portugalia*

6. Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
7. University of Washington, Seattle, USA
8. Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Uniwersytet Gdański (2003-2005)

Po ukończeniu jednolitych studiów magisterskich na kierunku Oceanografia Uniwersytetu Gdańskiego byłam zaangażowana w badania naukowe prowadzone w Zakładzie Chemii Morza i Ochrony Środowiska Morskiego. Badania te skupiały się na mikrowarstwie wody powierzchniowej i procesach na styku faz woda/powietrze. Zaowocowały one trzema publikacjami naukowymi z moim współautorstwem (Zał. 4, poz. II.1.2. (22), (23), (24)).

Stypendium naukowe - University of Aveiro, Portugalia (11. 2005 - 11. 2006)

W roku 2005 uzyskałam roczne stypendium naukowe w projekcie badawczym pt. „*Chemical characterization of urban aerosols PM_{2.5} and PM₁₀*” (nr. POCI/AMB/60267/2004) finansowanym przez portugalską Fundację dla Nauki i Technologii (*Fundação para a Ciência e a Tecnologia - FCT*) i realizowanym na Uniwersytecie w Aveiro w Portugalii. Podczas projektu zajmowałam się zbieraniem i analizą chemiczną próbek aerozoli. W Portugalii, ze względu na jej położenie geograficzne, istotne znaczenie w kształtowaniu aerozoli mają cząstki pochodzenia oceanicznego. W mojej pracy magisterskiej zajmowałam się procesem degradacji fotochemicznej w wodzie morskiej. Ponieważ zjawisko to zachodzi w warstwie powierzchniowej, ma ono znaczący wpływ na skład morskich aerozoli. W pracy w projekcie na Uniwersytecie w Aveiro mogłam więc wykorzystać i rozszerzyć moją wiedzę na temat procesów fizycznych i chemicznych na granicy faz woda/powietrze (np. segregacja i adsorpcja jonów). Praca przy realizacji projektu zaowocowała prezentacją na międzynarodowej konferencji geochemicznej *GU General Assembly 2008* (Zał. 4, poz. II.2.2.b (16)).

European Marie Curie Early-Stage Training Network – University of Münster, Niemcy (11. 2006-10. 2009)

W latach 2006-2009 prowadziłam badania na Uniwersytecie w Münster w ramach europejskiej sieci badawczej *European Marie Curie Early Stage Training Network* „*Mineral-fluid interface*

reactivity” *MIR-EST*. Badania te dotyczyły zrozumienia na poziomie molekularnym oddziaływań na granicy faz woda/ciało stałe. Główną techniką eksperymentalną była spektroskopia sił atomowych (*Atomic Force Microscopy – AFM*). Prowadzone przeze mnie badania zaowocowały obroną pracy doktorskiej pt. „*The effect of additives on water structure and solute hydration: Consequences for crystal nucleation, growth and dissolution*” i uzyskaniem stopnia doktora z najwyższą pochwałą (*summa cum laude*). To tu, po zaznajomieniu się z pracami uczonego Samoilov’a, narodziło się moje prawdziwe zainteresowanie wodą powierzchniową, jej strukturą, dynamiką i wpływem na organizację materii w roztworze.

W wyniku mojej pracy w ramach sieci *MIR-EST* powstał szereg publikacji naukowych w międzynarodowych czasopismach naukowych (Zał. 4, poz. II.1.1.b (14), (17); II.1.2 (18) - (21)) i prezentacji konferencyjnych (Zał. 4, poz. II.2.1. (11); II.2.2.a (12) – (15); II.2.2.b (17)).

Wymiana naukowa – *University of Oviedo, Hiszpania (2008, 3 miesiące)*

Moje badania prowadzone w ramach sieci *MIR-EST*, prowadzone głównie z wykorzystaniem techniki *AFM*, mogły zostać rozszerzone o dane termodynamiczne dzięki pomiarom kalorymetrycznym przeprowadzonym podczas mojej wizyty badawczej na Uniwersytecie w Oviedo. Badania te dostarczyły istotnych informacji na temat przemian energetycznych związanych z uwolnieniem wody hydratacyjnej w procesie tworzenia kryształów oraz wpływu jonów na stabilizację wody powierzchniowej. Wiedza ta okazała się niezwykle ważna w moich dalszych badaniach dotyczących samoorganizacji cząsteczek białka w roztworze. Prace eksperymentalne prowadzone na Uniwersytecie w Oviedo zaowocowały ponadto publikacją naukową, w której po raz pierwszy efekty określane mianem serii Hofmeistera zostały opisane w systemie nieorganicznym (Zał. 4, poz. II.1.1.b (16)).

European Marie Curie Reintegration Grant – *ITQB, Portugalia (04. 2010 – 03. 2013)*

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałam beneficjentką grantu *European Marie Curie Reintegration Grant* finansowanego przez Europejską Radę ds. Badań Naukowych (*European Research Council*), w ramach którego kierowałam 3-letnim projektem badawczym pt. „*Crystallization in ionic liquid solutions*” (PERG05-GA-2009-249182) realizowanym w Instytucie Technologii Chemicznej i Biologicznej (*ITQB*) w Portugalii. Projekt ten umożliwił mi wykorzystanie dotychczasowej wiedzy na temat wpływu jonów na wodę powierzchniową

dla kontroli procesu krystalizacji z zastosowaniem cieczy jonowych. Wyniki badań zostały opublikowane w serii artykułów naukowych (Załącznik 4. poz. II.1.1.b (12), (13), (15)), w tym w artykule na zaproszenie w specjalnym wydaniu czasopisma *CrystEngComm* (Załącznik 4. poz. II.1.1.b (13)). Praca ta pozwoliła na usystematyzowanie efektów cieczy jonowych (*ionic liquids – ILs*) na powinowactwo białek do wody (analogicznie do serii Hofmeistera). Została ona wyróżniona jako *Editor's Choice* wydawcy *Royal Society of Chemistry*.

R&D grant - ITQB, Portugalia (04. 2013 – 12. 2015)

Kolejnym etapem mojego rozwoju naukowego było uzyskanie finansowania ze środków Portugalskiej Fundacji dla Nauki i Technologii (FCT) na realizację projektu pt. “*The ionic liquid-based systems for protein crystallization*” (PTDC/BBB-BEP/3058/2012). Umożliwiło mi to nie tylko wzmocnienie umiejętności kierowania projektem badawczym, ale również sprawdzenie się w roli lidera zespołu. Projekt miał charakter interdyscyplinarny i łączył grupy badawcze z dwóch instytucji – Laboratorium Termodynamiki Molekularnej ITQB oraz Laboratorium Krystalografii Protein Uniwersytetu „Nowego” (NOVA) w Lizbonie. Zespół badawczy projektu liczył 12 osób, z tego dwie (*postdoc* oraz *postgraduate research fellow*) ze 100% dedykacją czasu pracy na rzecz projektu, pracowały pod moim bezpośrednim nadzorem merytorycznym.

Badania prowadzone w ramach projektu umożliwiły charakterystykę oddziaływań białek z cieczami jonowymi na powierzchniach stałych, depozycję w *Protein Data Bank* struktury białka wykrystalizowanego z użyciem cieczy jonowej (*4AO1, High resolution crystal structure of bovine pancreatic ribonuclease crystallized using ionic liquid, DOI: 10.2210/pdb4AO1/pdb*) oraz rozpoznanie wpływu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (IR) na samoorganizację cząsteczek białka w roztworze. W ten sposób projekt ten dał początek moim badaniom na temat oddziaływania IR z białkami. Projekt zaowocował serią publikacji naukowych (Załącznik 4, poz. II. 1.1.a (6); II.1.1b (9), (10), (11)) oraz wykładów na międzynarodowych konferencjach, w tym jednym na zaproszenie na *16th International Conference on Crystallization of Biological Macromolecules 2016* (Załącznik 4., poz. II.2.1.a (4)).

Grant FUGA - Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN (12. 2015-10. 2018)

W latach 2016-2018 byłam kierownikiem projektu finansowanego ze środków NCN w ramach konkursu FUGA (2015/16/S/ST4/00465) pt. „Wpływ promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni na oddziaływanie białek z powierzchniami stałymi”. Wyniki uzyskane podczas realizacji tego projektu wchodziły w skład przedstawionego przeze mnie osiągnięcia naukowego (Załącznik 4, poz. II.1.1.a (4) i (5)). Zostały one przedstawione między innymi w serii wykładów na zaproszenie na 3 konferencjach międzynarodowych (Załącznik 4, poz. II.2.1.a (1)-(3)) oraz zaowocowały zaproszeniem mnie w charakterze *Visiting Assistant Professor* na *University of Washington* w Stanach Zjednoczonych, co stanowiło kolejny etap mojej działalności naukowej w zagranicznym ośrodku naukowym.

Visiting Assistant Professor – *University of Washington, Seattle, USA*

(09. 2018 – 09. 2020)

W roku 2018 zostałam zaproszona przez profesora Geralda Pollack’a do spędzenia roku na stanowisku *Visiting Assistant Professor* na Wydziale Bioinżynierii Uniwersytetu Waszyngtońskiego. Było to dla mnie szczególnym wyróżnieniem ze względu na moje uznanie dla prac profesora Pollack’a, jak również prestiż samego Uniwersytetu będącego w czołówce światowych rankingów. Po roku udanej współpracy zostałam zaproszona do pozostania na kolejny rok na tym samym stanowisku, co za każdym razem wymagało zatwierdzenia mojej kandydatury przez członków Rady Naukowej Wydziału. To tutaj powstały kolejne prace wchodzące w skład mojego osiągnięcia naukowego (Załącznik 4, poz. II.1.1.a (1) – (3)) i będące fundamentem założeń projektu, którego obecnie jestem kierownikiem.

Grant SONATA Bis – *Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, Olsztyn*

(07. 2021 – dziś)

Od lipca 2021 jestem kierownikiem projektu badawczego pt. „Napięcie bariery hydrożelowej. Nowe spojrzenie na potencjał błonowy komórki i jego znaczenie dla wczesnego rozwoju zarodka” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata Bis, realizowanego w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

Jeszcze przed podjęciem pracy w Instytucie zostałam zaproszona do Instytutu na wymianę akademicką w ramach programu NAWA Prom. Wygłosiłam wówczas m.in. wykład dla pracowników Instytutu pt. „Effect of interfacial water structuring on protein behavior and defining membrane potential”. Moja dotychczasowa współpraca z Instytutem zaowocowała już

pracą przeglądową, gdzie mój wkład polegał głównie na zdefiniowaniu nowego mechanizmu antybakteryjnego i antywirusowego działania propolisu (Zał. 4, poz. II.1.1 b (7)).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

Bezpośredni nadzór merytoryczny nad pracą członków zespołu badawczego w kierowanym przeze mnie projekcie „*The ionic liquid-based systems for protein crystallization*” (PTDC/BBB-BEP/3058/2012) na stanowisku:

- *Postdoc* – Lina Juknaite (24 m-ce)
- *Research fellow* – Mateusz Marchel (24 m-ce)

Praca w projekcie zaowocowała 2 współautorskimi publikacjami dla Liny Juknaite (Zał 4, II.1.1.a (6); III.1.b (9)) oraz 3 współautorskimi publikacjami dla Mateusza Marchela (Zał. 4, poz. II.1.1.a (6); II.1.1.b (9), (10)). Udział w projekcie przyczynił się również do rozwoju naukowego Mateusza Marchela umożliwiając mu kontynuację badań w Instytucie ITQB na stanowisku studenta-doktoranta.

Prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów studiów magisterskich na kierunku Oceanografia Uniwersytetu Gdańskiego:

- Rok akademicki 2004/2005 *Hydrochemia* oraz *Chemia Morza* (90 godzin)

Dni otwarte Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN – 2017, 2018

- Współorganizacja tematycznej ścieżki pokazowej: „*Czy białe jest białe?*”

Prezentacja o charakterze popularnonaukowym na stronie Instytutu ITQB (badania wyróżnione jako szczególnie znaczące w osiągnięciach naukowych jednostki):

- *A new additive for better crystals. Researchers explore solid-supported ionic liquids for protein crystallization*
<https://www.itqb.unl.pt/news/a-new-additive-for-better-crystals>
- *Spontaneously formed nano-sized emulsions. Researchers show yet another property of ionic liquids*
<https://www.itqb.unl.pt/news/spontaneously-formed-nano-sized-emulsions>

- *Nearing the end of a crystallographers' nightmare? Study of ionic liquids' properties most suited for protein crystallization*

<https://www.itqb.unl.pt/news/nearing-the-end-of-a-crystallographers2019-nightmare>

Lektor języka polskiego jako języka obcego:

- 2018-2020 *The Juliusz Slowacki Polish School in Seattle (2 godz./tydzień)*

Wywiad udzielony Pani Annie Węgrowskiej dla portalu TVN24:

- 2020 *Propolis jako pierwsza linia ochrony przed koronawirusem*
<https://www.msn.com/pl-pl/tv/news/propolis-jako-potencjalny-lek/vp-BB1aIBZ8>

7. Inne informacje dotyczące kariery naukowej

Seminaria naukowe w jednostkach naukowo-badawczych:

- Institute of Chemical and Biological Technology António Xavier – 2011
ITQB SCAN-Seminar “*On the use of ionic liquids to tune crystallization: From inorganic to protein crystals*” (<https://www.itqb.unl.pt/events/seminars/scan-on-the-use-of-ionic-liquids-to-tune-crystallization-from-inorganic-to-protein-crystals>)
- Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN - 2016
Seminarium Instytutowe „*Wpływ czynników fizycznych i chemicznych na dynamikę struktury wody - konsekwencje dla procesu samoorganizacji materii*”
- Instytut Rozrodu i Badań Żywności PAN w Olsztynie - 2020
Seminarium Instytutowe, na zaproszenie w ramach programu NAWA Prom „*Effect of interfacial water structuring on protein behaviour and defining membrane potential.*”

Praca wyróżniona jako *Editor's Choice* przez wydawcę *Royal Society of Chemistry*:

- “Hofmeister effects of ionic liquids in protein crystallization: Direct and water-mediated interactions” Kowacz et al. *CrystEngComm*, 2012, 14, 4912-4921
<http://blogs.rsc.org/cc/2012/07/31/highlights-from-themed-issues-on-ionic-liquids/>

Wykład konferencyjny wyróżniony jako szczególnie wartościowy:

- Certificate of Recognition - *7th Visegrad Symposium on Structural System Biology* 2017, Nove Hrady, Republika Czeska

Moderacja sesji wykładów na międzynarodowej konferencji:

- 23. 06. 2017 *7th Visegrad Symposium on Structural System Biology*

Magdalena Kowacz

.....
(podpis wnioskodawcy)