



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alicji Sęk

***„Rola związków powierzchniowo czynnych w modyfikacji wybranych
właściwości modelowych błon biologicznych”***

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Alicji Sęk została przygotowana w Katedrze Zjawisk Międzyfazowych Instytutu Nauk Chemicznych Wydziału Chemii UMCS pod opieką promotorską dr hab. Aleksandry Szcześ, prof. UMCS. Rozprawa została przygotowana w postaci monografii napisanej w języku polskim, zaś wyniki badań w niej prezentowanych zostały dotychczas opublikowane w postaci trzech pełnotekstowych artykułów w czasopismach naukowych o wysokim prestiżu i międzynarodowym obiegu.

Celem podjętych badań było określenie wpływu niewielkich stężeń powszechnie stosowanych surfaktantów na modelowe układy błonowe. W badaniach wykorzystano zarówno model jednowarstwowy – monowarstwy Langmuira, jak i dwuwarstwowy – zawiesiny jednolamelarnych liposomów. Zgodnie z cytowaną przez Doktorantkę literaturą naukową monowarstwy Langmuira oraz liposomy są najczęściej stosowanymi przez naukowców modelami błon biologicznych. Układy te jednak są bardzo czułe na obecność substancji powierzchniowo czynnych, których nawet śladowa obecność w aparaturze pomiarowej może zafałszować wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem tych modeli. Z drugiej jednak strony modyfikacja struktury i własności fizycznych liposomów w obecności niewielkich stężeń surfaktantów może być skuteczną metodą produkcji preparatów liposomalnych stosowanych we współczesnej terapii. Dotychczas stosowano surfaktanty głównie na etapie produkcji liposomów, natomiast możliwości modyfikacji właściwości fizycznych gotowych liposomów przez surfaktanty nie są jeszcze wystarczająco poznane.

Recenzowana rozprawa liczy 140 stron i zachowuje tradycyjny podział na część literaturową i eksperymentalną. W części literaturowej Doktorantka

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



przedstawia podstawowe informacje dotyczące budowy błon biologicznych oraz lipidów będących ich głównymi składnikami budulcowymi. Po krótkim omówieniu błon biologicznych Autorka przybliży problem ich złożoności oraz konieczność stosowania uproszczonych modeli biomembran w badaniach podstawowych. Następnie przechodzi do omówienia podstaw wiedzy dotyczącej monowarstw Langmuira – sposobów tworzenia monowarstw, niezbędnej aparatury badawczej, uporządkowania cząsteczek w monowarstwie i podstawowych sposobów badania tych układów. W kolejnym rozdziale Doktorantka poświęca uwagę liposomom, omawiając sposoby ich tworzenia oraz przedstawiając klasyfikację tych tworów. W obu rozdziałach, zarówno tym dotyczącym monowarstw Langmuira jak i tym dotyczącym liposomów Doktorantka omawia podstawy technik eksperymentalnych wykorzystywanych przez Nią w badaniach, których wyniki stanowią trzon recenzowanej rozprawy. Sporo uwagi poświęca również związkom powierzchniowo czynnym, przedstawiając podstawowe informacje o ich budowie, zastosowaniach, dynamice i wielkości produkcji, czy też ich wpływie na biomembrany.

W części doświadczalnej recenzowanej rozprawy Doktorantka przedstawia wyniki badań dotyczących wpływu powszechnie stosowanych surfaktantów na modelowe biomembrany. W badaniach wykorzystwała surfaktant niejonowy Triton X-100, surfaktant anionowy SDS oraz surfaktant kationowy DTAB i jego homologi o większej masie cząsteczkowej: TTAB i CTAB. Oceniając dobór tych surfaktantów muszę stwierdzić, że jest on bardzo rozsądny. Triton X-100 jest niejonowym surfaktantem etoksylovanym. Tego typu surfaktanty są obecnie produkowane w ilościach megatonowych a wielkość ich produkcji w wielu krajach przekracza już tonaż produkcji surfaktantów anionowych, jak sulfoniany czy siarczany alkilowe, które dotychczas dominowały na rynku surfaktantów. Dodatkowo Triton X-100 jest powszechnie stosowany w pracach laboratoryjnych do lizy komórek i solubilizacji składników biomembran, czyli rzeczywiście jako substancja wszędobylska w laboratorium może zanieczyszczać aparaturę stosowaną w badaniach monowarstw Langmuira, czy liposomów. SDS, czyli siarczan dodecyłu jest najbardziej rozpowszechnionym przedstawicielem siarczanów alkilowych, często będąc głównym detergentem proszków do prania, czy preparatów czyszczących. Jest też jednym z najczęściej stosowanych

surfaktantów anionowych w badaniach laboratoryjnych. Bromki alkilotrimetyloamoniowe to z kolei najczęściej stosowane surfaktanty kationowe.

Jak już wspomniano Doktorantka prowadziła swoje badania w sposób komplementarny stosując zarówno modele jednowarstwowe – monowarstwy Langmuira jak i liposomy. Modele te tworzyła z dipalmitoilowej fosfatydylocholiny (DPPC), fosfatydylocholin częściowo (POPC) i całkowicie nienasyconych (DOPC) oraz z mieszaniny DPPC i cholesterolu o proporcji molowej 7/3. Biorąc pod uwagę deklarowany cel recenzowanej rozprawy dobór tych lipidów jest również bardzo rozsądny. DPPC jest najczęściej stosowanym fosfolipidem w badaniach naukowych. Wiąże się to z tym, że związek ten jest głównym składnikiem surfaktantu płucnego, a także jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych fosfatydylocholin w błonach plazmatycznych komórek ssaków. W błonach zwierzęcych niezwykle istotną rolę pełni cholesterol regulując ich płynność i przepuszczalność, stąd bardzo rozsądne było wykorzystanie przez Doktorantkę binarnego układu złożonego z DPPC i cholesterolu zachowującego proporcję obu lipidów typową dla zewnętrznej warstwy błony plazmatycznej komórki zwierzęcej. Fosfolipidy błonowe często zawierają w swoich łańcuchach alkilowych wiązania podwójne o geometrii *cis*. Wiązanie podwójne może pojawić się w jednym łańcuchu, w obu łańcuchach lub też łańcuchy te mogą być wielonienasycone zawierając kilka wiązań podwójnych. W literaturze naukowej dowiedziono, że obecność wiązań podwójnych wywiera znaczny wpływ na strukturę cząsteczki fosfolipidu i na tworzone przez te cząsteczki membrany, stąd jak najbardziej słuszne jest rozszerzenie przeprowadzonych badań na układy modelowe utworzone z POPC i DOPC.

W części badań, w której wykorzystano modele jednowarstwowe, monowarstwy Langmuira, Doktorantka rejestrowała izotermy ciśnienia powierzchniowego (π) oraz potencjału powierzchniowego (ΔV) w funkcji średniej powierzchni przypadającej na cząsteczkę w monowarstwie (A). Z przebiegu izoterm π - A obliczała wartości modułu ściśliwości C_s^{-1} i wykreślała je w funkcji ciśnienia powierzchniowego, co umożliwiało późniejszą dyskusję elastyczności badanych monowarstw. Badania te były prowadzone na różnych subfazach: czystej wodzie, roztworze buforowym tricine oraz roztworze



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



buforowym zawierającym badane surfaktanty w określonych stężeniach. Porównanie krzywych π -A, ΔV -A i C_S^{-1} - π zarejestrowanych przy różnych składach subfazy umożliwiło dyskusję wpływu poszczególnych surfaktantów na właściwości fizyczne badanych monowarstw. Dodatkowo Autorka przeprowadziła eksperymenty dotyczące penetracji surfaktantów do gotowej monowarstwy. W tym celu na buforowanej subfazie kompresowała badaną monowarstwę do ciśnienia 32 mN/m, przy którym upakowanie cząsteczek lipidów tworzących monowarstwę jest porównywalne z upakowaniem cząsteczek lipidów tworzących liposom, a następnie wstrzykiwała do subfazy roztwór surfaktantu i monitorowała ewolucję ciśnienia powierzchniowego w czasie.

W badaniach przeprowadzonych na układach dwuwarstwowych Doktorantka z tych samych lipidów tworzyła liposomy jednolamelarne o wielkości odpowiadającej LUV (large unilamellar liposomes). Najczęściej stosowała technikę hydratacji suchego filmu lipidowego, zaś liposomy LUV kalibrowała na drodze ekstruzji przez membranę poliwęglanową, tak by uzyskać pęcherzyki lipidowe o średnicy hydrodynamicznej około 100 nm. Po określeniu podstawowych właściwości tych liposomów, takich jak średnica hydrodynamiczna, współczynnik polidyspersyjności, czy potencjał elektroforetyczny, wprowadzała do zawiesiny liposomów badane surfaktanty i badała wpływ ich obecności na te parametry. Dodatkowo korzystając z tych parametrów obliczała dodatkowe czynniki charakteryzujące właściwości elektrostatyczne badanych liposomów. Przeprowadzone badania dowiodły, że niewielkie dodatki surfaktantów przy stężeniach rzędu μM , czyli około 1000 razy mniejszych niż krytyczne stężenie micelizacji mogą w istotny sposób wpływać na właściwości fizyczne układów modelujących błony biologiczne.

Rozprawa doktorska napisana jest starannie, a opublikowanie wyników rozprawy w postaci trzech pełnotekstowych artykułów weryfikuje przedstawione w rozprawie wyniki badań i ich interpretację zaproponowaną przez Doktorantkę. Obowiązkiem recenzenta jest jednak wskazanie pewnych nieprecyzyjnych stwierdzeń, czy też zadanie pytań dotyczących niektórych szczegółowych kwestii. Dlatego też w kolejnym rozdziale recenzji zatytułowanym uwagi i pytania recenzenta pozwolę sobie na zwrócenie uwagi Doktorantki na te kwestie:

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uwagi i pytania recenzenta

Str. 14

„Istotny wpływ na charakterystykę dwuwarstwy, w tym również na ruchliwość lipidów ją tworzących, ma stan fizyczny tych lipidów”

Zdanie sformułowane nieprawidłowo. Zapewne chodziło o strukturę lipidów tworzących dwuwarstwę. Określony stan fizyczny osiąga dwuwarstwa a nie lipidy.

Str. 20

Informacja w tabeli dotycząca granicznych wartości modułu ściśliwości cytowana jest błędnie. Pominięty jest postulowany przez autorów stan L, poza tym stan stały zaczyna się od 250 a nie od 1000 mN/m.

Wydział Chemii

Pytania:

Dlaczego w przeprowadzonych badaniach zdecydowano się stosować buforowaną subfazę?

Składniki buforów, w szczególności sole, silnie oddziałują z głowami polarnymi lipidów, powodując istotne zmiany właściwości fizycznych monowarstw Langmuira. Oddziaływanie lipidów ze składnikami buforów mogą maskować badane oddziaływania z surfaktantami.

Dlaczego zdecydowano się stosować bufor tricine?

Dlaczego zdecydowano się na stężenia 2,3 i 9,1 μM – skąd wynikają te konkretne wartości liczbowe?

Czy mierzono napięcie powierzchniowe zastosowanej subfazy oraz 2,3 i 9,1 μM roztworów badanych surfaktantów w tej subfazie?

Czy można wykluczyć, że sama obecność tych substancji przy tych stężeniach znacznie obniża napięcie powierzchniowe?

Str. 55

„Maksymalna wartość potencjału powierzchniowego odpowiada najbardziej pionowej orientacji cząsteczek w filmie lipidowym i zazwyczaj pokrywa się z maksymalnym stopniem kondensacji monowarstwy [113]”

Problem w tym, że w obecności niejonowego surfaktantu Tritonu X-100 wartość ta od samego początku kompresji jest większa niż dla DPPC na wodzie

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



lub buforze pod koniec kompresji. Dlaczego? Jak mają się te eksperymenty do modułu ściśliwości?

Z interpretacji zależności $C_s^{-1}-\pi$ wiadomo, że z rosnącym stężeniem surfaktantu uporządkowanie łańcuchów węglowodorowych DPPC w monowarstwie drastycznie maleje. Z kolei z przebiegu krzywych $\Delta V-1/A$ można by wyciągnąć wnioski przeciwne.

Obrazy BAM

W swoich badaniach Doktorantka zastosowała mikroskopię kata Brewstera (BAM). Część obrazów zarejestrowanych w tych badaniach została wykorzystana w publikacjach, np. w P1. Problem w tym, że do publikacji zdjęcia te zostały odpowiednio opracowane – odpowiednio dobrano jasność i kontrast, tak, że wszystkie opisywane domeny są wyraźnie widoczne. Natomiast w rozprawie doktorskiej doktorantka nie dopracowała obrazów BAM, w związku z czym są one bardzo słabo czytelne i bardzo trudno dostrzec na nich opisywane przez Autorkę szczegóły tekstury badanych monowarstw.

Wydział Chemii

Problem średnic hydrodynamicznych badanych liposomów

Str. 57

„Do badań wykorzystano liposomy o średnicy równaj 116,9 nm i współczynniku polidispersyjności wynoszącym 0,52”.

Czy chodzi o średnią średnicę hydrodynamiczną?

Jaka jest niepewność pomiarowa tej wielkości?

Dlaczego na rys. 24 nie ma słupków błędów?

Dlaczego tylko na Rys. 56 na str. 99 pokazany jest rozkład wielkości badanych liposomów? Podobne rysunki byłyby pomocne dla wszystkich badanych układów.

Str. 59 tabela 5 i wszystkie późniejsze analogiczne tabele

Dlaczego w tabelach zbierających właściwości elektrostatyczne liposomów nie podano informacji o niepewności pomiarowej prezentowanych wartości liczbowych?

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl

Rys. 27, str. 62

Jednostka na osi X – dlaczego μl ?



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Str. 62

„DPPC zbudowany jest z dwóch nasyconych łańcuchów palmitynowych o konformacji *trans*, przez co tworzy upakowaną warstwę „lipidową”. Konformacja łańcuchów w lipidzie zależy od upakowania monowarstwy. Skoro dla DPPC jest przejście LE-LC, to w obrębie fazy LE występują liczne defekty *gauche* w łańcuchach węglowodorowych. Dopiero dla fazy LC można założyć konformację *all-trans*.

Wydział Chemii

Str. 88

„Otrzymane czyste liposomy DOPC charakteryzowały się rozmiarem równym 125,8 nm”.

Niekonsekwencja w stosowanej terminologii. Każdorazowo powinna być mowa o średniej średnicy hydrodynamicznej.

Problem wielkości liposomów w obecności TTAB i CTAB, Str. 100, tabela 12

Wartości średnic hydrodynamicznych dla TTAB (wszystkie stężenia) i CTAB przy najmniejszym stężeniu są prawdopodobnie błędne. Przedstawiony przez doktorantkę opis zmian D_h pod wpływem tych surfaktantów jest niezgodny z tą tabelą.

Z kolei jednak na stronie 101 pojawia się stwierdzenie: „Ze względu na duże rozmiary liposomów w obecności TTAB i CTAB w zestawieniu uwzględniono jedynie układy domieszkowane surfaktantami zbudowanymi z 12-węglowego łańcucha alkilowego” – czyli jednak autorka dostrzega drastyczny wzrost D_h . W przypadku najmniejszego stężenia TTAB jest to wzrost ponad dziesięciokrotny. Podobnych zmian nie obserwowano dla innych układów w tej pracy. Bardzo proszę o komentarz i próbę wytłumaczenia przyczyn tak drastycznego wzrostu D_h . Czy podobne drastyczne wzrosty rozmiarów liposomów są znane z literatury? Bo jeżeli D_h rośnie od 120 nm do 1500 nm, to zgodnie z klasyfikacją przedstawioną na str. 25 recenzowanej rozprawy

ul. Gronostajowa 2
30-387 Kraków
tel. +48 12 686 26 00
fax +48 12 686 27 50
sekretar@chemia.uj.edu.pl
www.chemia.uj.edu.pl

liposom, który byłby klasyfikowany jako SUV staje się liposomem GUV. Czy nie doszło tu do zjawiska agregacji liposomów?



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Podsumowanie

Przedstawione powyżej uwagi i pytania recenzenta w żaden sposób nie umniejszają znaczenia przedstawionej rozprawy doktorskiej, mogą natomiast stanowić punkt wyjścia do dyskusji podczas publicznej obrony doktoratu. Przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Alicji Sęk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wydział Chemii

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom niniejszej rozprawy oraz znakomity dorobek naukowy: współautorstwo 3 publikacji bezpośrednio związanych z doktoratem i 4 publikacji z innej tematyki o łącznym czynniku oddziaływania 26,537 wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy mgr Alicji Sęk.

Marcin Broniatowski
Marcin Broniatowski

ul. Gronostajowa 2
30-387 Kraków
tel. +48 12 686 26 00
fax +48 12 686 27 50
sekretear@chemia.uj.edu.pl
www.chemia.uj.edu.pl