

Prof. dr hab. Paweł Krysiński

Pracownia Elektrochemii
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
02-093 Warszawa, Pasteura 1



Tel: (+4822) 8220211, wewn. 389

E-mail: pakrys@chem.uw.edu.pl

Fax: (+4822) 8225996

Warszawa, 05.09.2012

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Kotyńskiej, zatytułowanej: ***Równowagi adsorpcyjne pomiędzy błoną liposomalną a jonami elektrolitu o różnej wartościowości.***

Praca została przedstawiona jako rozprawa doktorska Radzie Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku.

Tematyka pracy dotyczy bardzo istotnych związków zachodzących między właściwościami i funkcjami błon biologicznych a ich budową i oddziaływaniami z otoczeniem. Jak pisze Autorka, badania tych związków mają kluczowe znaczenie dla poznania i zrozumienia funkcjonowania żywego organizmu. Ze względu jednak na skomplikowaną budowę naturalnych błon biologicznych, zależną w głównej mierze od rodzaju komórki, zrozumiałą jest decyzja tworzenia uproszczonych modeli błon komórkowych, których skład, a także środowisko w jakim się znajdują, kontrolowane są przez eksperymentatora.

Mocną stroną pracy jest próba zastosowania opracowanych modeli teoretycznych, zweryfikowanych w badaniach układów modelowych, do analizy zjawisk zachodzących w błonach biologicznych. Doktorantka próbę tę podjęła na przykładzie wpływu dwu wybranych środków farmakologicznych na płytki krwi i erytrocyty ludzkie, a także badając zmiany gęstości ładunku błon komórkowych tych samych komórek człowieka w zgonach nagłych. Podjęcie takiej tematyki świadczy moim zdaniem o dużej dojrzałości naukowej Pani mgr Joanny Kotyńskiej.

Ocena formalnej strony pracy.

Zanim przejdę do oceny merytorycznej rozprawy, do moich obowiązków należy też ocena strony formalnej pracy. Praca pisana jest językiem poprawnym, choć czasem zdarzają się literówki, językowe lapsusy i tzw. „kalki” z języka angielskiego. Kilka przykładów:

1. Autorka bardzo przywiązała się słowa „komponent” i stosowała go zamiast polskiego słowa „składnik”,
2. Str. 6, wiersz 7 od góry: „...problematyka dotycząca błon...”; ciekaw jestem, czym problematyka dotyka?
3. Str.7, w. 15 od góry: „Większość badań przeprowadzono przy współudziale fosfatydylocholiny”
4. Str. 27, w. 12 od dołu: „...odparowywanie fazami odwróconymi...”
5. Str. 41, w. 5 od góry: gdzie potencjał chemiczny ma „górze” i czy rzeczywiście, zgodnie z definicją gradientu, jon potrzebuje energii by przemieszczać się wbrew gradientowi stężenia?
6. Str. 62, drugi akapit: „Zasadniczą tezą ... było zbadanie oddziaływań...” i znów str. 84, pierwszy akapit: „Jedną z tez niniejszej pracy jest analiza zmian...”. Zbadanie i analiza może być celem pracy, którego efektem może być postawienie tezy.
7. Co to jest obszar międzyfazowy sfingomieliny, który posiada grupy akceptorowe i donorowe wiązania wodorowego (str. 72)?
8. Jak się zawiesza liposomy w chlorku sodu (str.120). Należy unikać żargonu laboratoryjnego, na rzecz dokładnego podania składu elektrolitu.

Śledzenie treści rozprawy utrudniało mi również dość dowolne umiejscawianie przecinków przez Autorkę, niezależnie od reguł interpunkcji.

Ogólnie rzecz ujmując, układ pracy liczącej wraz ze spisem literatury 153 strony , z odpowiednim wyważeniem części literaturowej w stosunku do eksperymentalnej, jest bez zarzutu. Wstęp, cel pracy oraz rozdział 3, dotyczący właściwości elektrycznych błon biologicznych, dobrze uzasadniają wybrany temat badań, umiejscawiając go w obecnym stanie wiedzy odnośnie równowag jonowych w błonach komórkowych.

Część literaturowa w sposób wystarczający wprowadza w treść części eksperymentalnej, podaje podstawy teoretyczne stosowanych technik pomiarowych, ułatwiając śledzenie toku wnioskowania Autorki. Ponad 200 pozycji literaturowych wykorzystanych w pracy pozwalają oczekiwać, że mgr Joanna Kotyńska w sposób znaczący pogłębiła swoją wiedzę w trakcie studiów doktoranckich; znajduje to zresztą dobre odzwierciedlenie w przedstawionej rozprawie

doktorskiej. Mam jedno zastrzeżenie co do wyboru literatury omawiającej ładunek powierzchniowy błon biologicznych: żadna z wybranych pozycji nie została wykorzystana do przedstawienia trójwymiarowości ładunku „powierzchni” komórek, a przecież np. kwas sialowy (N-acetyleneuraminowy), nadający erytrocytom ludzkim ładunek ujemny, nie znajduje się na powierzchni komórek, rozumianej jako zewnętrzna warstwa lipidowa, lecz związany jest z glikoproteinami błonowymi, tworząc trójwymiarowy obszar ładunku w pobliżu warstwy lipidowej. Doktorantka nie wspomniała o takiej budowie, Mogło to być spowodowane głównie badaniem liposomów. Jednakże chciałbym, by w trakcie obrony przedstawiony został model uwzględniający przestrzenne rozmieszczenie ładunku, np. błony erytrocytów ludzkich.

Oprócz pozytywnej mojej ogólnej oceny tej strony pracy (mimo powyższych uwag), zauważyłem trochę błędów formalnych i niekonsekwencji, które jako recenzent poniżej przedstawię, gdyż obrona rozprawy nie byłaby pełna, gdyby doktorantka nie miała się przed czym bronić. Poza tym pokazuję, z jaką uwagą przeczytałem tę rozprawę jako jej recenzent. Wobec tego, chciałbym prosić panią mgr Joannę Kotyńską o ustosunkowanie się do poniższych uwag:

1. W całej treści rozprawy posługuje się Pani terminem „ładunek powierzchniowy”. Czy z pomiarów mikroelektroforetycznych rzeczywiście uzyskiwała Pani ładunek powierzchni badanego układu?
2. Kiedy nie spełnione są założenia teorii Gouy-Chapmana dla układów biomimetycznych? Czy w przypadku badanych układów zachodzi taka obawa i nie należy np. traktować ładunku jako zlokalizowanego (przybliżenie Debye’a-Hückel’a)?
3. Jaka jest rola rozdziału **3.3. Potencjał transmembranowy i jego źródła**, w treści rozprawy? Czy istnieje związek potencjału transmembranowego z mierzonym przez Panią potencjałem elektrokinetycznym?
4. Nie mogłem znaleźć informacji, czy moc jonowa, od której wszak zależy ruchliwość elektroforetyczna, była kontrolowana podczas miareczkowania pH liposomów i komórek. Jeżeli tak, to w jaki sposób.
5. Jaki obraz ładunku na powierzchni liposomów może Pani przedstawić na podstawie stałych asocjacji wyznaczonych np. na str. 67. Chciałbym dowiedzieć się, czy nie da się porównać wartości pK_a i/lub pK_b badanych przez Panią grup funkcyjnych

zorganizowanych na powierzchni liposomów, z danymi literaturowymi odpowiednich pK amin, kwasów fosforowych i kwasów karboksylowych w roztworze wodnym? Wydaje mi się, że obserwacja większej kwasowości grupy fosforanowej fosfatydyloglicerolu w porównaniu do tej grupy w fosfatydylocholinie (obie w liposomach), str. 91, powinna nasunąć konieczność takiego porównania.

6. Czy punkt izoelektryczny wyznaczony przez Panią eksperymentalnie dla różnych jednoskładnikowych liposomów może być skorelowany z wyliczonymi stałymi asocjacji?
7. W jaki sposób wyznaczono stężenia objętościowe jonów w roztworze, które to wartości wykorzystywała Pani później we wszystkich modelach równowagowych? Czy przyjęto je jako stężenia początkowe, przed wprowadzeniem liposomów?
8. Jak wyjaśnić wyraźnie buforowy charakter powierzchni poślizgu liposomów (powierzchni liposomów) uformowanych z mieszanin lipidów w porównaniu do liposomów jednoskładnikowych (np. Rys. 7.7, 7.12, 7.13) w zakresie pH 5-8? Dotyczy to również komórek trombocytów i erytrocytów. Poza tym wydaje mi się, że badanie wpływu pH powyżej wartości 9 nie ma sensu? Czy liposomy i komórki nie ulegają hydrolizie?

Jestem przekonany, że Pani magister Joanna Kotyńska z powodzeniem ustosunkuje się do powyższych uwag i pytań w czasie obrony.

Reasumując tę część, pomimo powyższych uwag stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim.

Ocena merytoryczna.

Pozostaje mi ustosunkować się do wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej oraz poprawności wnioskowania na podstawie tych wyników. Wpływ związków jonów metali alkalicznych Doktorantka opisała równaniami równowag asocjacji/dysocjacji, które zakładają zobojętnianie ładunku. Model nie zakładał dodatkowych oddziaływań, jak na przykład tworzenie wiązań wodorowych, czy asocjacji cząsteczek lipidowych, traktując każdą z równowag niezależnie. Nawet przy takich uproszczeniach rozwiązania analityczne były trudne; cieszy wobec tego fakt dobrej zgodności modelu z wynikami eksperymentalnymi. W przypadku wybranych jonów trójwartościowych nie udało się doprowadzić modelu do postaci możliwej do rozwiązania. Być może uwzględnienie (konkurencyjnego do protonów) oddziaływania jonu

trójwartościowego z trzema grupami funkcyjnymi powierzchni liposomów, zamiast równowag typu grupa powierzchniowa-jon z następującym zobojętnianiem ładunku przez grupy hydroksylowe/chlorkowe (równania 8.3-8.8) uprościłoby model.

Bardzo ciekawe wydają się próby zastosowania modelu równowagowego w jego najprostszej postaci (cztery równowagi) do układów *in vitro* i *in vivo*, zarówno w przypadku oddziaływań wybranego leku przeciwplatekowego Plavix, jak kontrastu ultrasonograficznego – SonoVue. W przypadku erytrocytów nie stwierdzono znaczącego wpływu SonoVue na zależność ładunku powierzchniowego (powierzchni poślizgu) komórek od pH (do wartości pH 8-8.5; powyżej tej wartości pH wyniki moim zdaniem nie mają istotnego znaczenia praktycznego), traktowaną jako wskaźnik interakcji badanego środka z błoną komórkową. Natomiast wpływ tego środka na płytki krwi był wyraźny w zakresie pH 5-8. Szkoda tylko, że doktorantka nie podała ani stężenia Plavixu ani SonoVue w warunkach *in vitro*; jak rozumiem, odpowiadało ono stężeniu klinicznemu w maksimum farmakokinetycznym po podaniu do organizmu. Po zapoznaniu się z powyższymi wynikami eksperymentalnymi oraz przedstawionymi wnioskami odczuwam jednak pewien niedosyt, którym czuję się w obowiązku podzielić: choć w Tabeli 9.2 podano parametry modelowe, które dobrze odzwierciedlają wyniki eksperymentalne (Rys. 9.5), to nie znalazłem komentarza wyjaśniającego wpływ SonoVue na płytki krwi. Same cyfry do mnie nie przemawiają, tym bardziej, że różnice parametrów C_A , C_B , K_{AH} i K_{BOH} mieszczą się w granicach błędów. W przeciwieństwie do SonoVue, Plavix, choć jest lekiem przeciwplatekowym, nie wpływał na ładunek powierzchniowy płytek krwi (wyniki dla erytrocytów nie były pokazane). I tutaj również przydałby się komentarz.

W dalszej części pracy Pani mgr Joanna Kotyńska wykazała się dużą ambicją i odwagą, poddając weryfikacji użyteczność swojego modelowania (zmian parametrów modelu czterech równowag) dla erytrocytów i płytek krwi człowieka, w przypadkach zgonów nagłych. Materiał biologiczny uzyskany był we współpracy z Zakładem Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, zaś kontrolę stanowiły próbki krwi osób żywych (Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku). Doktorantka wykazała znaczące różnice w parametrach błony erytrocytów oraz płytek krwi w porównaniu z tymi komórkami ludzi zdrowych. Nie jest obecnie do końca wyjaśnione, jakie zjawiska odpowiadają za obserwowane istotne zmiany, ani jak zależą one od czasu pobrania komórek po nagłym zgonie. Ewidentne natomiast są zmiany równowag jonowych w błonie oraz zmiany ładunku

powierzchniowego. Ja sama Autorka wskazuje, przedstawione wyniki mają na tym etapie charakter rozpoznawczy, a ich analiza ilościowa i jakościowa wymaga dalszych badań, które mogą okazać się istotne dla medycyny, nie tylko sądowej.

Na koniec pragnę stwierdzić, że zarówno dotychczasowy dorobek naukowy jak i rozprawa doktorska Pani magister Joanny Kotyńskiej zawiera oryginalne wyniki o dużej wartości poznawczej. Rozprawę czytałem z prawdziwym zainteresowaniem, gdyż pojawia się w niej wiele istotnych wątków, także nowatorskich, nad którymi można jeszcze długo pracować, poszukując satysfakcjonujących wyjaśnień. Choć przedstawiłem powyżej wiele szczegółowych uwag krytycznych, nie chciałbym pozostawić negatywnego wrażenia. Wręcz przeciwnie, uznaję rozprawę za bardzo wartościową i jako poważne źródło inspiracji do dalszych badań w tej dziedzinie. Moje uwagi mają raczej za zadanie zasugerowanie tych kierunków i możliwości, niż stwierdzenie i podkreślenie niedopatrzeń.

Ocenę merytoryczną zakończę stwierdzeniem, że wyniki przedstawione w rozprawie zostały w większości opublikowane w 8 publikacjach naukowych, w tym 6 w czasopismach z listy filadelfijskiej o dużym współczynniku IF (np. J. Membrane Biol., J. Bioenerg. Biomembranes, Biophys. Chem., Biochim. Biophys. Acta). Doktorantka w 4 z nich jest pierwszą współautorką.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca całkowicie spełnia warunki określone w ustawie „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. nr 65, poz. 595, 2003 r., z późniejszymi zmianami, Dz.U., nr 164, poz. 1365, 2005r.) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanny Kotyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Paweł Krysiński