

**Opinia o rozprawie doktorskiej mgr Jana Pawłowskiego zatytułowanej:**

„Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi”

Błona komórkowa, będąca układem lipidów i białek, odpowiada za różnorodne funkcje komórkowe, od specyficznego transportu, wiązania receptorów, utrzymania enzymatycznej aktywności, po kontrolę oddziaływań międzykomórkowych. Bardzo złożony i różnorodny skład naturalnych błon oraz problemy związane z ich izolacją, bez naruszenia struktury, uniemożliwiają bezpośrednią analizę takich układów. Z tego powodu tworzy się wiele uproszczonych, sztucznych układów modelowych, o określonym składzie lipidowym i właściwościach błon biologicznych. Postępujący wzrost zainteresowania warstwami lipidowymi, jako układami biomimetycznymi, wynika z potrzeby lepszego zrozumienia natury reakcji przebiegających w żywych organizmach, na powierzchni membran komórkowych oraz poszukiwania selektywnych środków leczniczych i dozowania ich w kontrolowany sposób.

Do najczęściej stosowanych układów biomimetycznych do badania procesów membranowych i oddziaływań zachodzących na poziomie molekularnym w komórkach, dostarczających informacji o różnego rodzaju oddziaływaniach typu lipid-lipid, lipid-białko czy ligand-receptor, należą dwuwarstwy lipidowe na podłożu stałym. Dogodną techniką ich preparacji jest adhezja, scalanie pęcherzyków lipidowych (liposomów), ich pękanie i rozpływanie. Ta metoda nazwana „*techniką rozkładania liposomów*”, po raz pierwszy zaproponowana przez Briana i McConnella, jest często stosowana, między innymi do badania adsorpcji białek, ich samoorganizacji i lokalizacji w obszarze faz lipidowych oraz funkcji białek. Jest to dogodna technika preparacji wieloskładnikowych warstewek różnych lipidów i białek w środowisku wodnym, co ma istotne znaczenie szczególnie w przypadku białek, które mogłyby ulec procesowi denaturacji.

Pomimo różnorodności i dostępności wielu technik badania membran lipidowych na podłożu stałym przez dłuższy czas niedostępne były informacje o strukturze i właściwościach takich układów w skali manometrycznej. Taką charakterystykę umożliwia mikroskopia sił atomowych (AFM), która jest szeroko wykorzystywana do analizowania struktury i strukturalnych defektów membran, wpływu czynników zewnętrznych oraz składu filmów lipidowych na ich strukturę i organizację, a także śledzenia mechanizmów tworzenia warstewek lipidowych. Dodatkową zaletą tej techniki jest możliwość prowadzenia pomiarów w czasie rzeczywistym i w środowisku wodnym oraz bezpośredniego pomiaru fizycznych właściwości badanej powierzchni w wysokiej rozdzielczości.

Recenzowana praca doktorska zatytułowana „*Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi*” autorstwa pana mgr Jana Pawłowskiego, wykonywana pod opieką naukową dr hab. Sławomira Sęka, dobrze wpisuje się w badania układów biomimetycznych na poziomie molekularnym i wiąże się integralnie z tematyką badań prowadzonych w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.



Celem pracy było zbadanie właściwości fizykochemicznych układów biomimetycznych w postaci dwuwarstw lipidowych utworzonych z podstawowych lipidów błonowych: DPPC, DMPC, DOPC, również w mieszaninach z cholesterolem i sfingomieliną (imitujące tzw. rafty lipidowe) oraz natury specyficznego oddziaływania wybranych antybiotyków peptydowych (lizeniny i melityny) z tymi układami. Na podstawie wnikliwego przestudiowania tematycznej literatury dotyczącej charakterystyki i właściwości badanych lipidów i peptydów Doktorant starał się wybrać odpowiedni układ dwuwarstwy lipidowej utworzonej z lipidów błonowych na podłożu stałym, który preferuje powstawanie domen lipidowych bogatych w sfingomielinę lub sfingomielinę i cholesterol. W tym celu przeprowadził wiele dobrze zaplanowanych, usystematyzowanych i udokumentowanych badań doświadczalnych z wykorzystaniem między innymi:

- wanny Langmuira do zdefiniowania parametrów błony (ciśnienie, stan fizyczny, rozmiary cząsteczek) i określenia oddziaływań pomiędzy składnikami (organizacja i mieszalność składników) na granicy faz woda-powietrze;
- mikroskopii sił atomowych (ATM) i skaningowej mikroskopii tunelowej (STM) do badania *in situ* w środowisku wodnym procesu tworzenia dwuwarstw lipidowych na podłożu stałym w wyniku adhezji, scalania i pękania liposomów, zobrazowania ich struktury, analizowania rozdziału fazowego, wizualizację domen w dwu- i trójskładnikowych dwuwarstwach jako modelowych układów raftów lipidowych oraz mechanizmu oddziaływań peptydów z błonami lipidowymi.

Rozprawa doktorska mgr Jana Pawłowskiego zawarta jest na 205 numerowanych stronach łącznie ze stronami tytułowymi, spisem treści oraz zestawieniem cytowanej literatury. Praca składa się z trzech głównych części, w których Doktorant przedstawił przegląd literaturowy, badania własne obejmujące metodykę badań doświadczalnych oraz otrzymane wyniki z równoczesnym ich dyskusyjnym komentarzem zakończonym krótkim podsumowaniem każdego rozdziału. Taki sposób prezentacji wyników jest bardzo przejrzysty i godny polecenia. Cała praca zawiera 17 rozdziałów, przy czym dwa ostatnie obejmują krótkie streszczenie i wnioski oraz spis publikacji własnych. Na zakończenie Autor umieścił spis cytowanej literatury obejmujący 231 pozycji od 1891 roku.

Część literaturowa pracy została zredagowana na 72 stronach w 8 rozdziałach, gdzie omówione są zagadnienia związane z budową błon komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem raftów lipidowych oraz modelowymi układami biomimetycznymi: monowarstw na granicy faz ciecz-powietrze i dwuwarstw lipidowych na podłożu stałym. W literaturze opisanych jest wiele metod nanoszenia dwuwarstw lipidowych na stały nośnik. Autor skupił się na technice Langmuira-Blodgett, Langmuira-Schaefera oraz tzw. metodzie rozkładania liposomów. Kolejne rozdziały dotyczą charakterystyki dwóch antybiotyków peptydowych (melityny i lizeniny), oddziaływania lizeniny z błonami komórkowymi i modelowymi dwuwarstwami lipidowymi. Na zakończenie zostały omówione podstawy skaningowej mikroskopii tunelowej (STM) i mikroskopii sił atomowych (AFM). Przy redakcji części literaturowej Doktorant skorzystał z 184 odnośników, co świadczy o dobrym jego przygotowaniu merytorycznym do bardzo obszernych i wielowątkowych badań doświadczalnych i dyskusji otrzymanych wyników.



Przy ocenie tej części pracy chciałabym zwrócić uwagę na pewne nieścisłości.

- Na str. 17 Autor pisze „*Synteza glicerofosfolipidów polega na estryfikacji jednej z wolnych grup hydroksylowych reszty kwasu fosforowego za pomocą hydroksyzwiązków*”. Z pewnością chodzi tu o najprostszy glicerofosfolipid jakim jest kwas fosfatydowy, czyli *sn*-3-fosfodiacyloglicerol. Jego estrami są wszystkie glicerofosfolipidy.
- Pewna niekonsekwencja występuje w nazewnictwie związków chemicznych wykorzystywanych w badaniach. Doktorant stosuje często nazwy zwyczajowe a nie nomenklaturę systematyczną związaną z ich budową, np. 1,2-dioleoylo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC) zamiast 1,2-dioleoylo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC).
- Do określenia związków powierzchniowo aktywnych używany jest termin detergenty zamiast surfaktanty (**surface active agents**). Zwyczajowo detergent jest to pojedynczy surfaktant lub mieszanina surfaktantów (ze względu na zjawisko synergetyzmu) powszechnie stosowanych w preparatach myjąco-piorących.
- Na rys. 9 przedstawiony jest obraz (odzworowanie powierzchni) AFM (raczej nie zdjęcie AFM) dwuwarstwy lipidowej zawierającej sfingomielinę, DOPC i cholesterol w celu uwidocznienia domen lipidowych określanych, jako rafty lipidowe. Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją rafty lipidowe to niewielkie (10–200 nm), heterogenne, wysoce dynamiczne, wzbogacone w sterole i sfingolipidy, domeny oddzielające procesy komórkowe. Natomiast na wspomnianym rysunku niektóre domeny bogate w cholesterol i sfingomielinę, oznaczone jako zielone obszary, mają średnicę nawet do 2 μm czyli są 10 razy większe.
- Amfifilowość lipidów, będących głównymi składnikami błon biologicznych stwarza możliwość badania ich właściwości na powierzchniach międzyfazowych, między innymi, jako warstw Langmuira powstałych na granicy faz woda-powietrze. Trudno jest mi zgodzić się z Autorem, że warstewki naniesione na powierzchnię subfazy to warstwy adsorpcyjne, a tym bardziej ze zdaniem na str. 36 „*Gdy na granicę faz woda-powietrze zostanie wprowadzony związek nierozpuszczalny w cieczy lub adsorpcja na granicy faz następuje po zdyspergowaniu takiego związku w roztworze, w celu opisu układu należy posłużyć się równaniem adsorpcji Gibbsa*”. Występuje zasadnicza różnica w powstawaniu filmów Gibbsa oraz monowarstw Langmuira. Surfaktanty rozpuszczalne w wodzie tworzą, na drodze adsorpcji z wnętrza roztworu, tzw. rozpuszczalne filmy powierzchniowe, zwane inaczej filmami adsorpcyjnymi lub też monowarstwami Gibbsa. W celu znalezienia zależności pomiędzy wielkością adsorpcji na granicy faz roztwór-gaz a składem roztworu Gibbs przeprowadził rozważania termodynamiczne dotyczące równowagi w takim układzie. Z kolei związki amfifilowe nierozpuszczalne w wodzie po ich rozpuszczeniu w lotnym rozpuszczalniku i naniesieniu takiego roztworu na powierzchnię swobodną wody (po odparowaniu rozpuszczalnika) tworzą monomolekularne filmy powierzchniowe, zwane filmami nierozpuszczalnymi lub filmami Langmuira.
- Dla ścisłości równanie adsorpcji Gibbsa (równanie (8)) wiąże zmiany napięcia powierzchniowego ze stężeniami powierzchniowymi Gibbsa i zmianami potencjałów chemicznych składników roztworu. Wielkość n_i^σ (wymiar - mol) to nadmiar powierzchniowy lub adsorpcja Gibbsa, a Γ_i^σ to powierzchniowy nadmiar stężenia (wymiar - mol/m²).



- W równaniu (4) różniczka zupełna entalpii swobodnej to dG^σ (str. 35).
- W tekście w języku polskim odnośniki do rysunku i tabeli pisze się z małej litery.
- Na str. 38 Autor pisze „Znając stężenie oraz objętość naniesionej na granicę faz substancji, możliwe jest obliczenie powierzchni, jaka przypada na pojedynczą molekułę”. Chodzi tu raczej o objętość roztworu, a nie substancji. Konieczna jest również znajomość powierzchni subfazy wodnej, aby obliczyć powierzchnię przypadającą na pojedynczą cząsteczkę w danym stanie fizycznym (fazie) filmu.
- Zbytнім uproszczeniem jest stosowanie określenia powierzchnia molekularna zamiast powierzchnia dostępna dla pojedynczej cząsteczki na powierzchni subfazy lub powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę.
- Termodynamiczną charakterystykę mieszanych monowarstw można przeprowadzić w oparciu analizę nadmiarowej swobodnej entalpii (energii Gibbsa) (ΔG_{exc}) a nie nadmiarowej energii swobodnej Gibbsa (str. 42). W opisie wyników str. 124 pojawia się już poprawnie nadmiarowa swobodna entalpia.
- Wanna Langmuira nie służy do przenoszenia warstewek na podłoże stałe (str. 43). Do tego celu stosuje się wannę z wbudowaną studzienką zwaną wanną Langmuira-Blodgett.

Wymienione powyżej komentarze dotyczące nieścisłości i uchybień w części literaturowej nie zmieniają faktu, że praca doktorska zawiera obszerny, dobrze zaplanowany i interesujący materiał doświadczalny przedstawiony na 112 stronach w kolejnych 8 rozdziałach obejmujących, materiały i procedury badawcze, omówienie i dyskusję wyników, streszczenie i wnioski. Na podkreślenie zasługuje przejrzysta szata graficzna. Doktorant wyniki swoich badań zaprezentował na 79 rysunkach obejmujących obrazy AFM i STM, histogramy, zależności siła-odległość, izotermy π -A, zależności C_s^{-1} - π , ΔG_{exc} - π , ΔA_{exc} - π , ilustracji modeli struktury warstewek, a na 5 rysunkach wzory strukturalne badanych związków.

Istotną część pracy stanowią badania dotyczące właściwości fizykochemicznych modelowych jedno- i wieloskładnikowych dwuwartstw lipidowych na podłożu stałym w roztworze oraz monowarstw na powierzchni wody. W pierwszej kolejności koncentrują się one na obrazowaniu za pomocą AFM etapów pośrednich i organizacji dwuwartswy podstawowego lipidu błonowego DPPC na stałym nośniku w wyniku adhezji, zespalania, pęknięcia i formowania dwuwarstwy, a także określenie czynników mających wpływ na przebieg całego procesu (rodzaj podłoża – mika i złoto oraz obecność jonów wapnia).

Dalsze badania obejmowały obserwację dynamiki tworzenia dwuwarstwy DMPC/Chol (7/3) na powierzchni złota z wykorzystaniem techniki STM i AFM. Autor po raz pierwszy uchwycił moment pęknięcia liposomu oraz tworzenie nowych odrębnych struktur z pęcherzyka lipidowego. Wyniki tych ciekawych badań, rozszerzone o pomiary z wykorzystaniem mikrowagi kwarcowej (QCM), zostały opublikowane w czasopiśmie Langmuir, a mgr Jan Pawłowski jest pierwszym współautorem.

Przechodząc do układów wieloskładnikowych Doktorant rozpoczął badania od charakterystyki monowarstw jedno-, dwu- i trójskładnikowych DOPC, HSM i Chol na subfazie wodnej w wannie Langmuira, co w połączeniu z obrazowaniem powierzchni dwuwartstw wieloskładnikowych na powierzchni miki techniką AFM pozwoliło na określenie, przy jakich stosunkach molowych składników tworzą się domeny lipidowe



bogate w sfingomielinę lub sfingomielinę i cholesterol. Te kompleksowe badania pozwoliły na wybór dwuwarstw do określenia oddziaływań z antybiotykami peptydowymi: melityny – DOPC/HSM/Chol (7/7/6) i lizeniny – DOPC/HSM (1/1). W przypadku melityny obrazowanie zmian w strukturze dwuwarstwy rejestrowano po wprowadzeniu jej do celki pomiarowej AFM, natomiast do badania oddziaływań lizeniny ze sfingomieliną i domenami lipidowymi modyfikowanych chemicznie sond mikroskopu sił atomowych.

W ostatnim rozdziale zostały omówione wyniki badań dotyczących oddziaływań cząsteczek sfingolipidu (1-fosforo-N-palmitoilo-D-erythro-dihydroceramid – PDHC) z cholesterolem na powierzchni złota z wykorzystaniem elektrochemicznej odmiany skaningowej mikroskopii tunelowej (EC-STM).

Autor z nawiązką zrealizował zaplanowane do realizacji cele badawcze, które wymagały przeprowadzenia ogromnej ilości bardzo dobrze przemyślanych, systematycznych i precyzyjnych badań wymagających pracowitości i staranności. Trudno w recenzji szczegółowo przedyskutować wszystkie osiągnięcia naukowe Doktoranta, dlatego chciałabym zwrócić uwagę tylko na niektóre.

- Zastosowanie mikroskopii AFM i STM pozwoliło Autorowi na rejestrację w wysokiej rozdzielczości i w skali nano etapów procesu formowania dwuwarstwy w wyniku rozkładania liposomów, co w konsekwencji pozwoliło na wskazanie różnic w mechanizmie jej tworzenia na hydrofilowej powierzchni miki i hydrofobowego złota.
- Wykazanie, że pomiędzy polarną powierzchnią miki a dwuwarstwą DPPC pozostaje film wody o grubości do 3 warstw (ok. 1 nm), podobnie jak przy przenoszeniu wysoce zorganizowanych filmów Langmuira na podłoże stałe techniką Langmuira-Blodgett.
- Cenne jest również porównanie grubości dwuwarstw DPPC na podstawie analizy uzyskanych przekrojów odwzorowań warstewki i zależności siła-odległość zarejestrowanych za pośrednictwem spektroskopii sił atomowych.
- Pokazanie, że w przypadku wieloskładnikowych błon biomimetycznych zawierających DOPC i HSM zmiany w strukturze i organizacji dwuwarstwy związane są ze składem lipidów błonowych. Zaproponowanie struktur molekularnych dwuwarstw DOPC/HSM 1/1 (rys. 85) i 1/9 (rys. 88) o różnym składzie wewnętrznej i zewnętrznej warstwy w poszczególnych obszarach dwuwarstwy, wynikających z separacji fazowej sfingomieliny na fazę nieuporządkowaną L_d i ciekłą uporządkowaną L_o .
- Wykazanie na podstawie analizy krzywych siła-odległość, że dodatek cholesterolu wpływa zarówno na morfologię jak i strukturę poszczególnych obszarów domen lipidowych, potwierdzając jednocześnie wystąpienie efektu uporządkowania struktury warstw przez sterol.
- Przedstawienie na podstawie badań z zastosowaniem spektroskopii sił atomowych korelacji właściwości nanomechanicznych dwuwarstw lipidowych w zależności od składu i morfologii badanych układów modelowych.
- Przeprowadzenie kompleksowych badań oddziaływań dwu modelowych antybiotyków peptydowych z wybranymi układami biomimetycznymi, wykazującymi tendencję do tworzenia domen lipidowych pozwoliło zobrazować sposób i mechanizm ich oddziaływania – melityny przede wszystkim w obszarach matrycy lipidowej zawierającej głównie DOPC, natomiast lizeniny specyficznie wiążącej się ze



sfingomieliną. Są to istotne badania nie tylko ze względów poznawczych, ale także potencjalnego wykorzystania tych związków jako nowych leków antybiotykowych.

- Wykazanie na podstawie analizy zarejestrowanych obrazów STM warstw adsorpcyjnych PDHC/Chol na złocie istotnych różnic w mechanizmie ich tworzenia oraz nowej, dotąd nieobserwowanej struktury cholesterolu na tym nośniku. Może to świadczyć o tym, że cząsteczki sfingolipidu mogą w istotny sposób wpływać na strukturę powstających domen cholesterolowych.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na pewne niedoskonałości występujące w części eksperymentalnej i przy dyskusji wyników badań.

- Jak już wspomniałam przy omawianiu części literaturowej warstewki Langmuira tworzy się przez nanoszenie związków amfifilowych na subfazę wodną, dlatego tytuł rozdziału 9.2 „*Badania procesów adsorpcyjnych na granicy faz woda-powietrze i oddziaływań lipid-lipid*” uważam za niewłaściwy. Nawet, jeżeli chodziłoby o procesy adsorpcyjne to adsorpcyjne pisze się przez literę *p* a nie *b* (str. 5 i 86).
- Na str. 121 przy zdaniu „*Izoterma cholesterolu wykazuje silny wzrost, charakterystyczny dla monowarstwy o niskiej ściśliwości i wysokim stopniu upakowania cząsteczek*” cytowania jest pozycja [207] [M. Jurak, Changes in stability of the DPPC monolayer during its contact with the liquid phase, Chem. Phys. Lip. 165 (2012) 302–310]. Z tytułu tej pracy wynika, że badania dotyczą DPPC, nie cholesterolu. Cytowanie powinno dotyczyć pozycji [208] [M. Jurak, M. Gołąbek, L. Holysz, E. Chibowski, Properties of Langmuir and solid supported lipid films with sphingomyelin, Adv. Colloid Interface Sci. 222 (2015) 385–397]. Przy czytaniu prac, nie tylko rozprawy doktorskiej, często przydatne są tytuły cytowanych publikacji.
- Przy omawianiu wartości powierzchni A_o (str. 123) nie ma informacji jak ją wyznaczono. Jedynie na podstawie wartości przedstawionych w tabeli 6 można wnioskować, że przez ekstrapolację liniowego odcinka izotermy do zerowej wartości ciśnienia powierzchniowego. Wówczas A_o odpowiada powierzchni przypadającej na cząsteczkę w ściśle upakowanej monowarstwie na granicy faz ciecz-powietrze. Na str. 40 jest ona oznaczona symbolem A_s .
- Pewna niekonsekwencja występuje przy oznaczeniu nadmiarowej powierzchni i swobodnej entalpii w części literaturowej i eksperymentalnej, np. str. 42 – $\Delta A_{12,Exc}$, a na str. 124 ΔA_{exc} (czy są one równoważne?); $\Delta G_{12,Exc}$ vs. ΔG_{exc} .
- Na rys. 72 na str. 126 błędna jest legenda dla układu DOPC/HSM (1/1) i DOPC/HSM (1/9) w porównaniu do podpisu rysunku.
- W celu uzyskania kompleksowych informacji o właściwościach wieloskładnikowych błon biomimetycznych zawierających DOPC, HSM i Chol Autor wykorzystał wannę Langmuira i mikroskopię AFM. W przypadku dwuwarstw lipidowych proces ich tworzenia na mice prowadzony był w środowisku zbuforowanego roztworu soli fizjologicznej (bufor fosforanowy PBS o stężeniu 0,01 M i pH=7,4) o stężeniu jonów oraz ciśnieniu osmotycznym porównywalnym do panującego w ludzkich płynach ustrojowych, natomiast warstewki Langmuira nanoszono na powierzchnię wody. Obecność jonów z pewnością wpływa na proces tworzenia i właściwości badanych warstewek, dlatego warto by je uzupełnić o badania filmów Langmuira na subfazie buforu PBS.



Podsumowując stwierdzam, że praca prezentuje dobry poziom naukowy. Pod kątem językowym, edytorskim i merytorycznym napisana jest poprawnie. W tak obszernej pracy Doktorant nie uniknął usterek interpunkcyjnych, stylistycznych i językowych, np. nadużywając określeń anglojęzycznych, np. molekuła, kolaps (a nie kolpas,), powierzchnia molekularna, orientacja wertykalna zwłaszcza, że mają one polskie odpowiedniki.

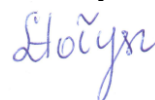
Przedstawione w recenzji uwagi i komentarze w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, która wnosi szereg istotnych elementów nowości naukowej tym bardziej, że część wyników została już opublikowana w renomowanym czasopiśmie międzynarodowych o wysokim współczynniku oddziaływania. Mogę jednocześnie stwierdzić, że mgr Jan Pawłowski posiada ugruntowaną wiedzę i umiejętności w badaniu układów imitujących naturalne membrany na poziomie molekularnym z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury, o czym świadczy 8 opublikowanych artykułów, w których jest współautorem.

Uważam, że recenzowana praca całkowicie spełnia wymagania odnośnie prac doktorskich określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595) i wnoszę o dopuszczenie mgr Jana Pawłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoki poziom naukowy badań i oryginalny wkład Doktoranta w rozwiązywanie postawionych problemów badawczych, o istotnym znaczeniu aplikacyjnym, wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Jana Pawłowskiego.

Lublin, 03.11.2015.

Prof. dr hab. Lucyna Hołysz



**Rada Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego****Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej
mgr Jana Pawłowskiego**

Praca doktorska zatytułowana „*Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi*” autorstwa pana mgr Jana Pawłowskiego została wykonana w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką naukową dr hab. Sławomira Sęka. Treść rozprawy dobrze wpisuje się w badania układów biomimetycznych na poziomie molekularnym i wiąże się integralnie z tematyką badań promotora. Celem pracy było zbadanie właściwości fizykochemicznych układów biomimetycznych w postaci dwuwarstw lipidowych utworzonych na podłożach stałych z podstawowych lipidów błonowych: DPPC, DMPC, DOPC, również w mieszaninach z cholesterolem i sfingomieliną (imitujące tzw. rafty lipidowe) oraz natury specyficznego oddziaływania wybranych antybiotyków peptydowych (lizeniny i melityny) z tymi układami. Autor z należytą starannością zrealizował zaplanowane do realizacji cele badawcze, które wymagały przeprowadzenia ogromnej ilości bardzo dobrze przemyślanych, systematycznych i precyzyjnych badań wymagających pracowitości i staranności oraz przestudiowania tematycznej literatury.

Niewątpliwym sukcesem i nowością naukową prezentowanej pracy są badania modelowych układów biomimetycznych w wysokiej rozdzielczości i w skali nano w środowisku wodnym w wyniku, których Doktorant między innymi:

- po raz pierwszy uchwycił moment pęknięcia liposomu oraz tworzenia odrębnych struktur z pęcherzyka lipidowego,
- wykazał różnice w mechanizmie oddziaływania badanych antybiotyków peptydowych z wybranymi układami biomimetycznymi, co ma istotne znaczenie przy potencjalnym wykorzystaniu tych związków jako nowych leków antybiotykowych,
- udokumentował istnienie nieobserwowanej do tej pory struktury cholesterolu w adsorpcyjnych warstwach lipidowych na złocie.

Różnorodność przeprowadzonych badań i umiejętność powiązania otrzymanych wyników świadczy o dużym profesjonalizmie Doktoranta i jego obszernej wiedzy. Na uwagę zasługuje szata graficzna rozprawy, sposób przedstawienia wyników oraz ich wnikliwa i zrozumiała dyskusja. O celowości i randze prowadzonych badań może świadczyć fakt, że część z nich została już opublikowana w czasopiśmie Langmuir. Pan mgr Jan Pawłowski posiada ugruntowaną wiedzę i umiejętności w badaniu układów imitujących naturalne membrany na poziomie molekularnym z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury, o czym świadczy 8 opublikowanych artykułów, w których jest współautorem.

Mając na uwadze wysoki poziom naukowy badań, inwencję badawczą i oryginalny wkład Doktoranta w rozwiązywanie postawionych problemów badawczych, o istotnym znaczeniu aplikacyjnym, sposób przedstawienia oraz dyskusję wyników, opublikowanie części badań w renomowanym czasopiśmie wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Jana Pawłowskiego.



Prof. dr hab. Lucyna Hołysz

Lublin, 03.11.2015.





dr hab. Maciej Mazur
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Warszawa, 1 grudnia 2015

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Jana Pawłowskiego, pod
tytułem "Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw
lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi"**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Jana Pawłowskiego pod tytułem "Badanie struktury i właściwości wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z antybiotykami peptydowymi" została zrealizowana w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrod na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem Pana dra hab. Sławomira Sęka.

Praca dotyczy otrzymywania warstw lipidowych na powierzchni miki oraz złota, określania dystrybucji składników warstw lipidowych metodami mikroskopii sił atomowych i skaningowej mikroskopii tunelowania, a także badania oddziaływań struktur lipidowych z wybranymi antybiotykami peptydowymi.

Dwuwarstwy lipidowe osadzone na stałych podłożach są układem modelowym błon komórkowych i dzięki temu umożliwiają badanie procesów biologicznych zachodzących w komórkach, np. działania toksyn bądź leków. Do charakterystyki dwuwarstw lipidowych wykorzystywany jest szeroki wachlarz metod fizykochemicznych, w tym metody mikroskopowe takie jak STM i AFM. Tym samym tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgra Pawłowskiego jest niezwykle ważna, aktualna i posiada bardzo istotny wymiar poznawczy.

Praca liczy 205 stron i składa się z części literaturowej, w której omówiono stan wiedzy w zakresie tematyki poruszanej w pracy, opisu procedur eksperymentalnych oraz części badawczej zawierającej oryginalne wyniki Autora.

Część literaturowa liczy 70 stron i dzieli się na 6 głównych rozdziałów. W pierwszym rozdziale (nr 3) Autor omawia budowę błon komórkowych oraz składniki budujące ich

strukturę, takie jak białka błonowe i lipidy. Opis lipidów jest bardziej szczegółowy i obejmuje kwasy tłuszczowe, fosfolipidy, sfingolipidy i sterole. W dalszej części dyskutowane są fizyczne zjawiska odpowiedzialne za tworzenie dwuwarstw lipidowych, takie jak np. efekt hydrofobowy. Opis jest poprawny, choć ograniczony do słownych rozważań jakościowych. Definiowane są również takie pojęcia jak micela, stężenie krytyczne micelizacji, struktury kubiczne. Zaskakujące, że w tym kontekście nie pojawia się pojęcie liposomu jako struktury asocjacyjnej tworzonej przez lipidy.

W kolejnych podrozdziałach mgr Pawłowski opisuje rodzaje faz tworzących się w dwuwarstwach lipidowych oraz parametry wpływające na ich właściwości fizykochemiczne. Bardziej szczegółowo omówione jest zjawisko tworzenia tzw. raftów lipidowych oraz znaczenie udziału takich struktur w procesach fizjologicznych zachodzących w organizmach żywych.

Rozdział drugi części literaturowej (numerowany jako 4) dotyczy zjawisk adsorpcji lipidów na granicy faz woda-powietrze. Wyjaśnione zostały pojęcia napięcia powierzchniowego, ciśnienia powierzchniowego oraz funkcji termodynamicznych obszaru międzyfazowego. Zamieszczono również (nieco pobieżne) wyprowadzenie równania adsorpcji Gibbsa. W dalszej części omówiona została technika Langmuira oraz szczegółowo przebieg typowych izoterm adsorpcji. Definiowane są również wielkości nadmiarowej powierzchni molekularnej oraz nadmiarowej entalpii swobodnej Gibbsa.

Rozdział oznaczony numerem 5 omawia metody przenoszenia warstw molekularnych na stałe podłoża, takie jak technika Langmuira-Blodgett i Langmuira-Schaefera. Osobny podrozdział poświęcony jest metodzie rozkładania liposomów. Autor dyskutuje jakie warunki geometryczne muszą spełniać cząsteczki lipidów, żeby mogły tworzyć pęcherzyki lipidowe. Omawia metody otrzymywania liposomów oraz ich zastosowania. Następnie szczegółowo opisuje mechanizmy tworzenia dwuwarstw lipidowych w wyniku rozkładania liposomów, wskazując czynniki odpowiedzialne za efektywność tego procesu.

Kolejny rozdział (nr 6) dotyczy toksyn peptydowych. Są to związki o charakterze peptydów, które oddziałują z błonami komórkowymi prowadząc do ich destrukcji. Mgr Pawłowski omawia różne mechanizmy działania toksyn (tzw. mechanizm dywanowy, beczkowy, toroidalny), szczególną uwagę poświęcając melitynie i lizeninie - związkom wykorzystywanych w swojej pracy badawczej.

Część literaturową kończą dwa dobrze napisane rozdziały omawiające techniki STM i AFM.

Przegląd literaturowy pracy doktorskiej Pana mgra Pawłowskiego sprawia bardzo dobre wrażenie. Część ta jest napisana w sposób zrozumiały, wyczerpujący i merytorycznie poprawny. Świadczy to o dużej wiedzy Doktoranta, precyzji formułowania myśli i naukowej dojrzałości. Ewentualne zastrzeżenia można mieć co najwyżej do tego, czego nie znajdziemy w części literaturowej. W opinii recenzenta zabrakło omówienia niektórych kwestii szczegółowych bezpośrednio związanych z prezentowanymi wynikami badawczymi Autora, co wskazane zostanie w dalszej części recenzji. Z kolei niektóre fragmenty z części badawczej należałoby przenieść do przeglądu literaturowego. Dotyczy to w szczególności dwóch i pół stron tekstu z rozdziału 15.

Część badawcza rozprawy doktorskiej liczy 105 stron. W rozdziale zatytułowanym "Część eksperymentalna" opisane są dość szczegółowo materiały i odczynniki, aparatura oraz procedury doświadczalne. Przy opisie odczynników chemicznych zabrakło podania skrótów stosowanych w pracy (w szczególności dotyczy to stosowanych lipidów) - ułatwiłoby to niewątpliwie lekturę pracy.

Na opis oryginalnych badań składa się 6 głównych rozdziałów.

Pierwszy z nich, numerowany jako 10, zawiera wyniki badań AFM rozkładania liposomów na powierzchni miki oraz złota. W szczególności pomiary dotyczą osadzania liposomów z lipidu DPPC na powierzchni miki. Autor wykazał, ilustrując to serią zdjęć mikroskopowych, że kolejne etapy tego procesu obejmują adsorpcję, ewentualnie fuzję zaadsorbowanych liposomów, a następnie ich pękanie i tworzenie dwuwarstwy lipidowej. Ponadto zademonstrował, iż trwałość liposomów i szybkość tworzenia dwuwarstwy lipidowej są znacząco większe, jeżeli w roztworze znajdują się jony wapnia. Dlaczego badania były prowadzone w buforze fosforanowym, skoro problemem może być strącanie CaHPO_4 ?

Na podstawie Rys. 43 przedstawiającego sekwencję zdjęć AFM zaadsorbowanych liposomów o różnych rozmiarach Autor wnioskuję, że "rozmiar liposomów odgrywa drugorzędną rolę w procesie formowania dwuwarstwy". W ocenie recenzenta, na podstawie tak wątpliwych przesłanek jak seria rejestrowanych co pięć minut zdjęć kilku liposomów, wysnuwanie tak daleko idących wniosków jest nieuzasadnione.

Pojawia się w tym miejscu szereg kolejnych pytań, m. in. o rozmiary i trwałość stosowanych liposomów DPPC w roztworze. Jaki był rozmiar liposomów zanim uległy one adsorpcji na podłożu (Pan mgr Pawłowski zauważa, że w wyniku adsorpcji tworzą się tzw. dyski liposomowe, których kształt jest silnie zdeformowany)? Czy w roztworze zachodzi w znaczący sposób proces fuzji liposomów, a jeśli tak, jaka jest skala czasowa tego procesu w relacji do szybkości tworzenia warstwy lipidowej na powierzchni miki?

W dalszej części pracy Autor badał osadzanie dwuwarstw lipidowych na powierzchni złota. Wykazał, że adsorpcja liposomów zachodzi znacznie trudniej na złocie niż na powierzchni miki. Liposomy przez dłuższy czas pozostają w formie zaadsorbowanej i dopiero w następnej kolejności w szybkim procesie formują dwuwarstwę. Czy formowanie dwuwarstwy na powierzchni złota przez DPPC zachodzi według podobnego mechanizmu jak w przypadku DMPC (wyniki opisane w rozdziale 11), gdzie najpierw tworzą się struktury lamelarne, które przekształcają się w hemimicelle, a następnie dwuwarstwę? Niestety brak w tym zakresie komentarza.

Na podstawie przekrojów topograficznych Pan mgr Pawłowski szacuje grubość dwuwarstw lipidowych. W przypadku warstw na micy postuluje obecność cienkiej warstwy wody pomiędzy podłożem, a cząsteczkami lipidów, podczas gdy w przypadku złota cząsteczki DPPC mają znajdować się w bezpośrednim kontakcie z metalem. Scenariusz ten wydaje się prawdopodobny, choć brak silnych argumentów natury doświadczalnej to potwierdzających.

Grubości warstw lipidowych były wyznaczone również na podstawie rejestrowanych krzywych siła-odległość. Na stronie 103 czytamy: "W pewnym momencie na przebiegu krzywej obserwuje się charakterystyczną nieciągłość, która wskazuje, że sonda penetruje dwuwarstwę...". Co Autor miał na myśli pisząc o nieciągłości?

Wyznaczone powyższą metodą wartości są przeciętnie nieco wyższe od otrzymanych z przekrojów topografii (Tabela 5, str. 104), choć porównywanie jest utrudnione, gdyż w pierwszym wypadku podana jest średnia z błędem, a w drugim przedział wartości. Czym spowodowana jest różnica w formie przedstawiania wyników?

W rozdziale 11, Pan mgr Pawłowski omawia badania tworzenia dwuwarstw mieszanych DMPC/cholesterol na złocie, na podstawie wysokorozdzielczych pomiarów EC-STM i EC-AFM. Uzyskane zdjęcia robią na recenzencie ogromne wrażenie, a fakt ich rejestracji świadczy o tym, że mgr Pawłowski jest naprawdę wysokiej klasy specjalistą w zakresie mikroskopii z sondą skanującą. Autor wykazał, że pierwszym etapem adsorpcji lipidów jest tworzenie płaskich lameli przez cząsteczki DMPC. Struktura taka stabilna jest przez ok. 30 min, po czym przekształca się w układ hemimiceli. Co istotne, struktury takie były obrazowane przy ujemnych wartościach potencjału elektrodowego (vs. SCE). Zwiększenie potencjału do wartości dodatnich powodowało reorganizację cząsteczek i utworzenie dwuwarstwy.

Niezwykle ciekawym wynikiem jest uchwycenie momentu pęknięcia liposomu na obrazie AFM. Jak pisze mgr Pawłowski, liposom "pęka tworząc falę lipidową (...) stopniowo formującą struktury micelarne na powierzchni złota". Wynik niewątpliwie piękny. Można

jednak zadać sobie pytanie, na ile obserwacja jest zgodna z proponowanym modelem. Czy owa fala lipidowa początkowo ma postać lameli, które przekształcają się w hemimicelle? I czy pękanie liposomów jest procesem raczej incydentalnym (mgr Pawłowski twierdzi, że nikt w literaturze dotychczas nie pokazywał takiego wyniku), czy dominującym?

Wyniki przedstawione przez Pana mgr Pawłowskiego nasuwają jeszcze jedną uwagę. Dlaczego w części literaturowej nie został szczegółowo omówiony mechanizm tworzenia warstw zaproponowany dla praktycznie identycznego układu przez dr Sęka i wsp. w wybitnej publikacji w JACS z roku 2008? Proponowany tam przebieg procesu jest znacząco różny. Recenzent prosiłby, aby Pan mgr Pawłowski w trakcie obrony pracy doktorskiej krytycznie przedyskutował ową pracę w świetle swoich wyników doświadczalnych. W dyskusji należałoby też uwzględnić wyniki z artykułu, którego mgr Pawłowski jest współautorem (Langmuir 2015, 31, 11012).

Rozdział 12 omawia badania właściwości wieloskładnikowych warstw lipidowych metodą Langmuira oraz AFM. W tym pierwszym przypadku dokonano oceny oddziaływań międzymolekularnych wewnątrz warstwy lipidowej, mieszalności poszczególnych składników oraz wyznaczono odpowiednie parametry termodynamiczne. Otrzymane wyniki są bardzo przydatne jako dane wyjściowe do dalszych badań z wykorzystaniem AFM.

Badania mikroskopowe początkowo obejmowały obrazowanie oraz wyznaczanie grubości dwuwarstw jednoskładnikowych (DOPC, sfingomielina). Dla sfingomieliny Autor postuluje obecność dwóch faz (L_d , L_o), których wysokość różni się ok. 0.5 nm (co zostało oszacowane na podstawie przekrojów topograficznych). Jednakże histogram skonstruowany z krzywych siła-odległość dla tego układu (Rys. 76) ma rozkład monomodalny, co sugeruje jednakową wysokość faz. Niestety brak jest komentarza odnośnie zgodności wyników z tych dwóch rodzajów pomiarów. Czy dla dwuwarstwy sfingomieliny obecna jest cienka warstwa wody pomiędzy podłożem a lipidami? Czy w wyznaczanych wartościach uwzględniane są poprawki z modelu Hertza (tak jak dla dwuwarstw DPPC)?

Badania mikroskopowe dwuwarstw dwuskładnikowych potwierdzają generalnie wyniki otrzymane techniką Langmuira. Dla układu DOPC/HSM 9/1 obserwuje się jedną fazę, a dla DOPC/HSM 1/1 i 1/9 - separację fazową. Na podstawie pomiarów krzywych siłowych określono liczbę współwystępujących faz oraz ich parametry (grubość, siła przebiccia) i na tej podstawie dokonano również ich identyfikacji. Dla niektórych układów udało się wręcz wyznaczyć grubości poszczególnych monowarstw tworzących dwuwarstwę lipidową. Analiza danych eksperymentalnych jest bardzo skrupulatna, wyniki przekonujące i użyteczne, a

proponowane modele graficzne przedstawione niezwykle estetyczne. Podobna analiza została przeprowadzona też dla układu trójskładnikowego (dla dwóch składów DOPC/HSM/CHOL).

Kolejny rozdział (nr 13) dotyczy badań wpływu antybiotyku peptydowego melityny na trwałość i strukturę dwuwarstw trójskładnikowych (DOPC/HSM/CHOL). Roztwór wodny peptydu o różnych stężeniach wprowadzano do naczynka mikroskopu AFM i rejestrowano obrazy mikroskopowe dwuwarstwy osadzonej na powierzchni miki. Mgr Pawłowski zaobserwował, że dodatek melityny powodował niszczenie matrycy DOPC, podczas gdy domeny wzbogacone w sfingomielinę i cholesterol wykazują się względną trwałością. Etapy degradacji matrycy DOPC udało się zaobserwować rejestrując kolejno po sobie obrazy mikroskopowe po dodaniu peptydu. Pierwszym etapem jest tworzenie nieregularnych defektów o rozmiarach kilkuset nanometrów i głębokości ok. 2 nm. We wnętrzu defektów obecne są nieregularne struktury, które mgr Pawłowski przypisał agregatom melityny i lipidów. W kolejnych etapach następuje reorganizacja cząsteczek dwuwarstwy lipidowej do charakterystycznej karbowanej struktury, a po dłuższym czasie desorpcja lipidu z powierzchni miki.

Rozdział 14 dotyczy badań toksyny białkowej lizeniny i jej oddziaływania z dwuwarstwami HSM i HSM/DOPC. Inaczej niż w przypadku melityny, lizenina unieruchamiana była na ostrzu sondy AFM, po czym obrazowano dwuwarstwy, jak również wyznaczano siły oddziaływania pomiędzy sondą a dwuwarstwą.

W tym miejscu warto zwrócić uwagę na opis procedury modyfikacji ostrza AFM na stronie 87 (rozdział 9.3). Stosowana metoda jest bardzo podobna do opisanej w pracy Kobayashiego i wsp. (Biochemistry 2012, 51, 74). Brak jest jednak do niej odnośnika, co należy uznać za uchybienie (artykuł ten jest natomiast cytowany w innym miejscu, na str. 171). Podobieństwo nie oznacza oczywiście pełnej tożsamości; mgr Pawłowski zastosował pewne modyfikacje pierwotnej procedury, np. brak oczyszczania powierzchni sondy AFM ultrafioletem, dziesięciokrotnie niższe stężenie lizeniny w roztworze, itp. Rodzi się jednak pytanie, czy zmodyfikowana procedura przyłączania białka jest równie skuteczna jak w pracy oryginalnej. Mgr Pawłowski nie przeprowadził badań potwierdzających modyfikację ostrza; jedynym jej potwierdzeniem jest to, że uzyskane wyniki badania dwuwarstw lipidowych przy użyciu takich ostrzy wydają się rozsądne. Oprócz modyfikacji lizeniną, do ostrza AFM przyłączany był kowalencyjnie tryptofan. Tu również brak jakichkolwiek wyników potwierdzających modyfikację ostrza, ale Pan mgr Pawłowski wnioskuje: "Na podstawie otrzymanych wyników udowodniono, że tryptofan nie wykazuje specyficznego oddziaływania wobec cząsteczek sfingomieliny".

Określenia typu "udowodniono", bądź "zweryfikowano" przewijają się bardzo często w pracy doktorskiej mgr Pawłowskiego. Jest to oczywiście nieprawidłowe. Autor powinien wiedzieć, że w naukach eksperymentalnych nie dowodzi się hipotez, a jedynie potwierdza w testach doświadczalnych. Recenzent poleca Panu mgrowi Pawłowskiemu klasyczną pozycję książkową w tym zakresie: "Struktura rewolucji naukowych" autorstwa Thomasa Kuhna.

W rozdziale 15 Autor powraca do badań elektrochemicznego STM lipidów na powierzchni złota. Tytuł rozdziału jest nieco mylący: "... badania oddziaływań sfingolipidów z cholesterolem". Wydaje się, że metodą STM Autor bada raczej orientację molekuł na powierzchni, a informacja o oddziaływaniach molekularnych uzyskiwana jest jedynie pośrednio. Nie zmienia to faktu, że wyniki zamieszczone w omawianym rozdziale są bardzo ciekawe i należy je ocenić niezwykle wysoko. Autorowi udaje się uzyskać świetnej jakości obrazy STM warstw PDHC, na których można zaobserwować np. przestrzenne ułożenie łańcuchów węglowodorowych, a nawet rozróżnić poszczególne grupy metylenowe. Recenzent jest pod ogromnym wrażeniem otrzymanych wyników! Nie oznacza to jednak, że nie ma uwag krytycznych. Dlaczego inaczej niż w poprzednich rozdziałach zamiast liposomów stosowana jest zawiesina lipidów w wodzie? Jakiej wielkości są cząstki w zawiesinie i jak ich rozmiar ma wpływ na strukturę warstwy molekularnej na powierzchni złota? Czy w wyniku stosowanej procedury osadzania lipidów otrzymuje się dwuwarstwę (po odpowiednio długim czasie)?

Mgr Pawłowski badał również mieszaniny PDHC i cholesterolu uzyskując nietypowe obrazy warstwy lipidowej, jakie nie były dotychczas publikowane w literaturze. Wynik jest niezwykle interesujący, ale jednocześnie trudny w interpretacji. Niewątpliwie badania te należy pogłębić, a być może okażą się w przyszłości znaczącym osiągnięciem.

Pracę dokorską kończy blisko sześć stron podsumowania. Grupuje ono najważniejsze osiągnięcia przedstawione w pracy i nie budzi zastrzeżeń poza kwestiami poruszonymi w recenzji powyżej.

Z obowiązku recenzenckiego należy wspomnieć, że praca zawiera 124 rysunki i schematy, 7 tabeli i 231 odnośników literaturowych. Język pracy jest poprawny i zrozumiały, rażą nieco stosowane od czasu do czasu kalki językowe, np. "celka elektrochemiczna", czy "mimikować". Jeśli chodzi o stronę edycyjną, praca jest bardzo staranna i nie budzi zastrzeżeń.

Wnioski końcowe

Po szczegółowym zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pana mgra Jana Pawłowskiego stwierdzam, że cele pracy zostały klarownie zarysowane, a dobór metod i materiałów jest adekwatny do ich realizacji. Praca wpisuje się w rozwijaną na całym świecie dziedzinę układów biomimetycznych, które z jednej strony pozwalają badać procesy zachodzące w przyrodzie, a z drugiej umożliwiają ich naśladowanie, np. w obszarze medycyny, analizy chemicznej czy biokatalizy. Wyniki badawcze uzyskane przez Pana mgra Jana Pawłowskiego mają charakter badań podstawowych, ale istotny jest również ich wymiar aplikacyjny, np. mogą one znaleźć zastosowanie przy projektowaniu nowych leków lub konstrukcji biosensorów.

Uważam, że głównym atutem pracy doktorskiej Pana mgra Pawłowskiego jest otrzymanie bardzo wysokiej jakości danych mikroskopowych, które pozwoliły w precyzyjny sposób określić strukturę i właściwości warstw lipidowych. Techniki STM i AFM są niezwykle trudne do stosowania w badaniu takich układów, a otrzymanie wartościowych wyników z ich użyciem jest sporym wyzwaniem.

Jestem pod wrażeniem pomysłowości, wiedzy i dojrzałości naukowej Pana mgra Jana Pawłowskiego. Bez wątpienia jest to błyskotliwy młody naukowiec o dużych predyspozycjach do pracy badawczej. Opinię tę potwierdzają liczne publikacje w bardzo dobrych czasopismach naukowych (8 pozycji), których Pan Pawłowski jest współautorem.

Chciałbym podkreślić, że poruszone w recenzji kwestie mają charakter uwag polemicznych. Ich celem jest sprowokowanie pogłębionej dyskusji o pracy badawczej mgra Pawłowskiego i nie mają one wpływu na moją bardzo wysoką ogólną ocenę pracy doktorskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że praca doktorska spełnia wszelkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pana mgra Jana Pawłowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką ocenę merytoryczną pracy doktorskiej, nowatorstwo, jak również fakt opublikowania części wyników badawczych w formie znaczących publikacji, wnioskuję o jej wyróżnienie.





dr hab. Maciej Mazur
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Warszawa, 1 grudnia 2015

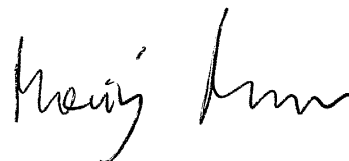
**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgra Jana
Pawłowskiego, pod tytułem "Badanie struktury i właściwości
wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływań z
antybiotykami peptydowymi"**

Praca doktorska Pana mgra Jana Pawłowskiego zawiera innowacyjne wyniki badań dwuwarstw lipidowych oraz ich oddziaływania z wybranymi toksynami peptydowymi takimi jak melityna i lizenina. Podjęta przez mgra Pawłowskiego tematyka jest niezwykle ważna, gdyż pozwala na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w błonach komórkowych na poziomie molekularnym. Wpisuje się ona w nurt prowadzonych na całym świecie badań dotyczących układów biomimetycznych.

Do najważniejszych osiągnięć mgra Jana Pawłowskiego należy zaliczyć uzyskanie wysokorozdzielczych zdjęć STM i AFM, które pozwoliły po raz pierwszy w literaturze określić mechanizmy formowania dwuwarstw lipidowych na stałych podłożach. Należy podkreślić, iż tak wysokiej jakości dane mikroskopowe są unikalne w skali polskiej, a wyróżniające w skali światowej. Na uwagę zasługują również badania domen wieloskładnikowych dwuwarstw lipidowych, w tym ich właściwości mikromechanicznych - mgr Pawłowski twórczo rozwinął metodykę badań i zaproponował nowe sposoby identyfikacji faz na podstawie pomiarów AFM. Z kolei badania oddziaływania toksyn peptydowych z dwuwarstwami lipidowymi oprócz aspektu poznawczego mają duże znaczenie aplikacyjne, gdyż mogą one być istotne w diagnostyce i leczeniu niektórych chorób, np. choroby Niemann-Picka.

Dorobek naukowy mgra Jana Pawłowskiego jest bardzo znaczący i obejmuje osiem publikacji w bardzo dobrych periodykach naukowych o zasięgu światowym. Należy podkreślić, że znaczna część wyników zamieszczonych w pracy doktorskiej nie została jeszcze opublikowana, co pozwala przywidywać, iż korzystając z zebranego materiału doświadczalnego w najbliższym czasie Pan Pawłowski przygotuje kolejne publikacje.

Ze względu na powyższe wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Jana Pawłowskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Henryk' followed by a stylized surname.