

Prof. dr hab. Andrzej Dworak

Zabrze, 26 sierpnia 2015

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Justyny Ciejki „Polimerowe adsorbenty wirusów wywołujących choroby układu oddechowego”

Celem, jaki postawiła sobie Autorka, było przebadanie oddziaływań kilku jonowych polimerów z wybranymi wirusami, wywołującymi choroby układu oddechowego: wirusami grypy, zapalenia płuc, rinowirusami i koronawirusami.

Materiały polimerowe, które bada Autorka, to przede wszystkim syntetyczne polimery oparte na pochodnych polialililoaminy i poli(alkoholu winylowego), pochodne naturalnych polisacharydów, przede wszystkim chitozanu i karagenanów. Polimery te zaopatrzone są w nośnik ładunku, decydujący o ich oddziaływaniu z wirusami.

Cel, jaki postawiła sobie Autorka, jest niewątpliwie ważny, a wyniki prac mogą mieć znaczenie aplikacyjne. Badane przez Autorkę wirusy grypy, zapalenia płuc, rinowirusy i koronawirusy są źródłami zawsze dokuczliwych, częstych i często niebezpiecznych chorób układu oddechowego. Asortyment dostępnych leków antywirusowych jest ograniczony, także dlatego, że wirusy, proste w swojej budowie, łatwo mutują przekształcając się w formy odporne na stosowane leki. Polimerowe środki lecznicze mogą się przyczynić do rozwiązania wielu problemów pojawiających się w leczeniu schorzeń wywołanych przez wirusy, co skutecznie pokazuje Autorka. W końcu podkreślić należy, że w swoich pracach Autorka wykorzystwała w większości materiały polimerowe, których synteza została wcześniej opracowana w zespole prof. Nowakowskiej, co znacznie ułatwiło rozwiązanie postawionego przez Autorkę zadania badawczego.

W części, nazwanej wstępem teoretycznym, Autorka opisuje badane wirusy i sposób ich oddziaływania z komórką gospodarza. W zwięzły, zrozumiały sposób opisuje strukturę wirusów: wirusa grypy, metapneumowirusa, rinowirusa i koronawirusa. Dalej opisuje koniugaty polimerów z antywirusowymi związkami niskocząsteczkowymi, wskazując na ograniczenia takich koniugatów w terapii, biopolimery o działaniu antywirusowym, polisacharydy z grupami siarczanowymi (karagenany), i wreszcie znane syntetyczne polimery działające przeciwwirusowo. Tam, gdzie to możliwe, Autorka opisuje mechanizm działania antywirusowego makrocząsteczek.

W ostatnich rozdziałach „wstępu teoretycznego” Autorka omawia mikrocząstki: sposób ich syntezy i pokrywania warstwą biologicznie aktywną, a także dyskutuje zagadnienia związane z hydrożelami o znaczeniu antywirusowym.

Podkreślić należy z uznaniem, że po omówieniu każdego z tych zagadnień Autorka krótko wskazuje, wyprzedzając niejako tok wyводу, do czego omówione zagadnienia zostały wykorzystane w dalszej, własnej pracy Autorki. Ten niestety niezbyt powszechny zabieg znakomicie pomaga w lekturze i zrozumieniu pracy.

Wstęp teoretyczny zawiera elementy, niezbędne dla śledzenia i uzasadnienia toku badań Autorki. Jest zwięzły i jasno napisany. Wynika z niego jasno cel i potrzeba badań własnych, opisanych dalej.

Część doświadczalna ogranicza się w zasadzie do spisu stosowanych odczynników i materiałów, wykazu niektórych instrumentów i opisu tych eksperymentów biochemicznych, które Autorka uznała za wspólne dla prowadzonych badań. Nie ma tam „części chemicznej”, opisującej syntezy polimerów i małych cząstek. Te dane zawarte są każdorazowo w rozdziałach, opisujących bardziej szczegółowo wyniki. Autor niniejszej recenzji uważa, że taki układ, choć nietypowy, jest właściwy i ułatwia lekturę pracy: specyficzne eksperymenty są opisane tam, gdzie analizowane są ich wyniki. Ułatwia to zrozumienie dość obszernej i multidyscyplinarnej pracy.

Pierwszą grupą polimerów, których działanie antywirusowe bada Autorka, to pochodne polialliloaminy, w których dodatni ładunek jonu amoniowego zastąpiono ujemnym ładunkiem grup sulfonowych. Autorka podaje metody otrzymywania i dowód struktury polimerów (choć można tu sobie wyobrazić pełniejszy opis).

Wyjściowe polimery, polialliloaminy, są wysoko toksyczne w stosunku do badanych linii komórkowych. Sulfonowanie zdecydowanie zwiększyło tolerancję nadanych komórek na obecność tak zmodyfikowanych polimerów, otwierając tym samym drogę do dalszych badań.

Autorka wykazała antywirusową aktywność otrzymanych sulfonowanych polimerów, stwierdzając, że jest ona znaczna, zarówno *in vitro*, jak i *ex vivo*, zależna od masy molowej polimeru i stopnia sulfonowania. Badane materiały przewyższają karagenany także w tym, że nie tworzą z jonami Ca i Mg żeli trudnych w stosowaniu terapeutycznym.

Ciekawe są wyniki badań mechanizmu antywirusowego działania badanych polimerów. Analiza danych skłania Autorkę do sformułowania tezy, że antywirusowe działanie badanych sulfonowanych polimerów polega na blokowaniu uwalniania nowych cząstek wirusowych po wnikięciu wirusa do komórki.

Autorka stwierdza także – co ważne – że spektrum działania antywirusowego badanych sulfonowanych pochodnych jest dość szerokie.

W kolejnym, piątym rozdziale pracy Autorka poszukuje polimerowych środków przeciwko koronawirusom. Wybiera dwie pochodne chitozanu, obie niosące dodatni ładunek grupy amoniowej, z których jeden jest modyfikowany hydrofobowo przez podstawienie długim łańcuchem alifatycznym, a także bada pochodną polialkoholu winylowego i poli(chlorowodorek alliloaminy). Stwierdza, że znaczną antywirusową aktywność

wykazują pochodne chitozanu. Co więcej, mechanizm ich działania polega na uniemożliwieniu penetracji wirusa do komórki gospodarza, co pozwala myśleć o wziewnym stosowaniu takich leków.

Autorowi recenzji trudno było jednak w tym punkcie ustalić wkład doktorantki w uzyskanie wyników, pisze ona bowiem, że polimery otrzymała z Zespołu Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Wydziału Chemii UJ, a badania biologiczne zostały wykonane przez mgr Zalewską w Zakładzie Mikrobiologii tej uczelni.

Dalsze części pracy Autorka poświęca otrzymaniu i badaniu właściwości, w tym oddziaływań z wirusami, nano- i mikrocząstek pokrytych warstwami wcześniej zbadanych przez Autorkę bioaktywnych polimerów.

W tej części kierują Autorką nie tylko potrzeby opracowania środka antywirusowego, ale także dość oczywista perspektywa, że takie układy znaleźć mogą zastosowanie do izolacji i oczyszczania wirusów, procedur o istotnym znaczeniu w opracowaniu leków.

Nanocząstki złota i srebra otrzymuje się powszechnie w procesie redukcji, także w reakcji rozpuszczalnych związków tych metali z polimerami, zawierającymi grupy aminowe. Stąd też nasunęła się możliwość wykorzystania chitozanu i jego pochodnych jako reduktorów i warstw stabilizujących nanocząstki. Autorka wykorzystwała badaną poprzednio, także pod względem właściwości antywirusowych (inhibitor replikacji koronawirusów), pochodną chitozanu zawierającą czwartorzędowe grupy amoniowe.

W opisie wydaje się być zawarta sprzeczność: na stronie 144 Autorka pisze „chitozanu nie można użyć do otrzymywania nanocząstek srebra” i uzasadnia, dlaczego (potencjał elektrochemiczny), a dalej na tej samej stronie „HTCC oraz chitozan wykorzystano do redukcji kwasu chlorozłotowego (III) oraz azotanu srebra, otrzymując w ten sposób odpowiednio AuNPs i AgNPs stabilizowane polimerem CHIT oraz HTCC”. W dalszym ciągu Autorka omawia tylko HTCC jako stabilizator nanocząstek srebra.

Autorka charakteryzuje stabilizowane nanocząstki technikami spektroskopowymi, a ich rozmiary dynamicznym rozpraszaniem światła i skaningową mikroskopią elektronową. Oczywiście dane o rozmiarach są rozbieżne, co Autorka, jak wszyscy, przypisuje faktowi, że rozpraszanie fotonów uwzględnia rozmiary silnie hydratowanej polimerowej otoczki, bardzo zresztą w takim wypadku dużej, a SEM jedynie rozmiary rdzenia. Wszelako wydaje się, że i sposób uśredniania może mieć wpływ: średnice otrzymane z pomiarów DLS to trzeci moment rozkładu.

Autorka zbadła cytotoksyczność otrzymanych nanocząstek Au i Ag i ich oddziaływania antywirusowe. Nanocząstki Ag są silnie cytotoksyczne, co czyni badanie ich aktywności antywirusowej bezprzedmiotowym. Cząstki Au nie są cytotoksyczne, natomiast nie wykazują aktywności antykoronawirusowej.

Kolejny etap badań Autorki poświęcony jest badaniu cząstek o rdzeniu zbudowanym z chitozanu, usieciowanego genipiną, którym na powierzchni nadano ładunek dodatki przez podstawienie części grup aminowych chlorkiem glicydylotrimetyloamoniowym. Autorka prowadzi wystarczająco precyzyjny dowód struktury (choć do pewności wniosków wyciągniętych na podstawie analizy elementarnej można podchodzić z ostrożnością), charakteryzuje potencjał zeta otrzymanych cząstek i ich rozmiary.

Są to cząstki dość duże, rzędu kilku mikrometrów. Po filtracji Autorka otrzymuje cząstki małe (ca. 50 nm). Szkoda, że Autorka nie podaje, czy filtracja usunęła część cząstek, czy też naprężenia ścinające towarzyszące filtracji spowodowały rozpad wielkich agregatów.

Otrzymane cząstki Autorka wykorzystuje do adsorpcji wirionów koronawirusa. Adsorpcja zachodzi z wielką wydajnością, niemal ilościowo, gdy powierzchnia zawiera odpowiednią liczbę dodatnich ładunków. Wirusy można łatwo odzyskać, dokonując desorpcji przez proste zwiększenie siły jonowej roztworu, a desorbowane wirusy zachowują niemal niezmienną zakaźność. Stanowi to o dużym znaczeniu opisanych w tej części badań, gdyż otwiera drogę do stosunkowo prostej metody separacji i oczyszczania tego wirusa, fakt ważny dla wirusologii.

Alternatywnym materiałem o potencjalnych zdolnościach do adsorpcji koronawirusów, badanych przez Autorkę, były mikrosfery krzemionkowe, pokryte metodą „warstwa po warstwie” pochodną chitozanu i heparyną. Mikrosfery pokryte pochodną chitozanu wykazywały nieźle właściwości adsorpcyjne. Pokrycie kolejną warstwą ujemnie naładowanej heparyny zdecydowanie przeciwdziała adsorpcji wirusów.

Do obowiązków recenzenta należy zwrócić uwagę na błędy lub słabe strony, jeśli takie znalazł.

Nie znalazłem ich wiele, mimo starań. Praca jest napisana logicznie, ciąg rozumowania jest wyraźny, wnioski dobrze uzasadnione. Język jest bardzo poprawny.

Nieliczne błędy łatwo zrozumieć. Wszelako zwrócić należy uwagę, że praca interdyscyplinarna, łącząca elementy chemii polimerów, biochemii i farmacji wymaga wielkiego nakładu pracy i wielkiej staranności, gdyż powinna przynajmniej w swojej istocie być zrozumiała dla przedstawicieli każdej z tych specjalności.

Niektóre drobne niezręczności:

Schemat sieciowania na rys. 13 budzi niejakiemu zdziwienie chemików, gdyż w pozycji b) czynnik sieciujący jest w zasadzie katalizatorem reakcji sieciowania, a nie jest reagentem

Wydaje się, że rysunek 21 nie ma głębszego sensu, gdyż pokazuje on jedynie przeliczenie stosunku siarki do azotu na stopień podstawienia, a nie fizyczną zależność.

Przedstawienie stosunku wartości jako np. „4,4 log” raczej w chemii nie jest stosowane.

Interpolacja z trzech punktów, pokazana na rys. 34, musi być określona jako odważna.

Skrót „rcf”, określający przyspieszenie w wirówce, jest z pewnością dobrze znany biochemikom, ale chemikom mniej i powinien być zdefiniowany.

„Przeładowany” oznacza po polsku nadmiernie naładowany, a nie określa zmiany znaku ładunku, choć tu akurat łatwo się tego znaczenia domyślić.

„przy pomocy techniki DLS otrzymano objekty...” (str. 168) to oczywista niezręczność językowa.

W końcu, recenzent byłby wdzięczny za unikanie intraligatorów oprawiających prace w taki sposób, że do lektury potrzebne są dwie osoby: jedna do trzymania egzemplarza w pozycji otwartej, druga do czytania i pisania.

Wyżej wymienione, czasem dyskusyjne usterki wymieniam jedynie z recenzenckiego obowiązku. W żadnej mierze nie rzutują one na wysoką wartość pracy.

Podsumowując stwierdzić należy, że opisane przez Autorkę badania dostarczyły wielu wartościowych z punktu widzenia badań podstawowych wyników, które mogą mieć wielkie znaczenie w farmacji i wirusologii.

Autorka wykazała, że sulfonowane pochodne polialililaminy hamują replikację wirusa grypy i pokazała prawdopodobny mechanizm ich działania. Wykazała, że pochodne chitozanu, niosące ładunek dodatni działają w sposób specyficzny antywirusowo wobec koronawirusów i opisała prawdopodobny mechanizm ich działania.

Autorka uczciwie i słusznie nie pisze, jakoby uzyskała nowy lek antywirusowy, i nie można tego oczekiwać, nie ulega jednak wątpliwości, że ustalenia Autorki są doniosłe i powinny być przedmiotem badań biochemików i farmaceutów, gdyż wyraźnie wskazują na możliwość otrzymania efektywnie działającego leku.

Prace nad nano- i mikrocząstkami nie doprowadziły wprawdzie do wykazania ich farmaceutycznej wyższości, jednak zdolności separacyjne tak otrzymanych materiałów otwierają nowe możliwości łatwej separacji, a w konsekwencji oczyszczania badanych wirusów.

W mojej opinii, praca spełnia z nadmiarem wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65). Wniosuję o dopuszczenie mgr Justyny Ciejki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie pragnę zwrócić uwagę na fakt, że badania mgr Ciejki są przedmiotem trzech publikacji, w bardzo dobrych czasopismach naukowych oraz trzech zgłoszeń patentowych. Były one także prezentowane na naukowych konferencjach, w tym wielu renomowanych. Ten fakt umacnia moje przekonanie o wielkim znaczeniu naukowym badań doktorantki, wynikające z lektury przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Justyny Ciejki.

Andrzej Krowczyński