



CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Inżynierii Materiałów Polimerowych

ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź

Profesor Stanisław Słomkowski

Kierownik Zakładu

Telefon: (42)-680-3253

Fax: (42)-680-3261

E-mail: staslomk@cbmm.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr chem. lek. med. Moniki Dzieciuch-Rojek

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Liposomalny układ hybrydowy do celowanej terapii przeciwnowotworowej w raku jelita grubego

Recenzowana praca dotyczy zagadnień zarówno z obszaru chemii koloidalnych nośników związków biologicznie czynnych jak i badań biologicznych z wykorzystaniem linii komórkowych oraz zwierząt; badań tworzących podstawy przyszłych prac klinicznych i opracowania nowych metod terapeutycznych. Została wykonana pod opieką prof. dr hab. Marii Nowakowskiej, w której zespole (Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego) od wielu lat prowadzone są prace dotyczące syntezy związków organicznych, w szczególności polimerowych, przydatnych do zastosowań medycznych, oraz pod opieką prof. dr hab. Marcina Majka z Zakładu Transplantologii Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Praca może być przykładem badań interdyscyplinarnych. Jej celem było opracowanie sposobów otrzymywania nowego typu liposomalnych form leku potencjalnie przydatnego w leczeniu choroby nowotworowej jelita grubego. W badanym układzie jako związek bioaktywny został wybrany 5-fluorouracyl, znany od lat składnik tradycyjnych leków przeciwnowotworowych, których wady wskazują na potrzebę opracowania nowych form. Na nośniki doktorantka postanowiła wykorzystać hydrofilowy i biokompatybilny poli(tlenek etylenu) wyposażony w ugrupowania kwasu foliowego oraz lipidu 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfatydyloetanolaminy. Immobilizowane jednostki kwasu foliowego miały służyć jako elementy kotwiczące nośniki na powierzchni komórek nowotworowych bogate w receptory kwasu foliowego. Dzięki specyficznej budowie chemicznej syntetyzowanych polimerów

przewidywano, że będą one zdolne do tworzenia liposomów, do których wnętrza zamierzano wprowadzić 5-fluorouracyl. Oczekiwano, że specyficzna budowa biwarstwy liposomów powinna umożliwić wprowadzenie do niej itrakonazolu. Spodziewano się, że obecność itrakonazolu może modulować funkcje komórek skutkujące opornością tych ostatnich na leki przeciwnowotworowe. Poza otrzymaniem i zbadaniem właściwości fizykochemicznych wspomnianych wyżej nośników zawierających wszystkie wymienione wyżej elementy doktorantka postawiła przed sobą zadanie zbadania ich oddziaływań, w układzie modelowym, z ludzkimi komórkami gruczolaka okrężnicy – linia Caco-2. Ponadto zdecydowała się na przeprowadzenie badań biodystrybucji otrzymanej formy potencjalnego leku w układzie *in-vivo*.

Przeprowadzenie badań i opracowanie wyników prowadzące do przedłożonej przez doktorantkę rozprawy wymagało od niej wiedzy w wybranych obszarach syntetycznej chemii organicznej, chemii fizycznej, biochemii oraz biologii, a więc wiedzy z różnych tradycyjnie uformowanych dziedzin.

Ze względu na swoją wiedzę i doświadczenie jestem przygotowany do oceny rozprawy w obszarach syntezy i badań fizykochemicznych otrzymywanych nośników. Badania biologiczne mogę oceniać jedynie ze względu na poprawność wnioskowania i logikę argumentacji. Moja wiedza w tym obszarze mimo iż wyraźnie większa niż wiedza większości chemików jest znacznie bardziej ograniczona niż wiedza biologów i lekarzy. W swojej ocenie do zagadnień biologicznych będę odnosił się w znacznie mniejszym stopniu.

Mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek przygotowała i przedstawiła rozprawę doktorską w formie tradycyjnej. Stanowi ją opracowanie zwarte, na które składają się: wprowadzenie i określenie celu pracy, licząca 48 stron część teoretyczna, w której zostały omówione biologia nowotworów złośliwych, epidemiologia nowotworów złośliwych, współcześnie stosowane terapie chorób nowotworowych, stosowane obecnie terapie raka okrężnicy, oporność wielolekowa komórek nowotworowych oraz nanomedycyna stosowana w leczeniu chorób nowotworowych a także liczący 81 stron opis badań własnych, krótkie podsumowanie i wnioski a także streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawę poprzedza bardzo przydatny dla czytelnika spis stosowanych skrótów. Rozprawę zamykają: wykaz publikacji naukowych i prezentacji konferencyjnych doktorantki oraz informacja o jej stażach naukowych a dopełnia ją spis cytowanej literatury liczący 292 pozycje.

W recenzji rozprawy, podobnie jak w recenzjach innych recenzowanych przeze mnie prac doktorskich, postaram się odpowiedzieć na następujące pytania:

- Czy doktorantka dysponuje aktualną wiedzą w zakresie prowadzonych badań dotyczących rozprawy?
- Czy badania odprowadziły do rozwoju wiedzy w obszarze tematyki doktoratu?
- Czy w badaniach zostały zastosowane właściwe metody badawcze oraz czy opisy doświadczeń są prawidłowe i wystarczające?
- Czy interpretacja uzyskanych wyników odpowiada aktualnemu stanowi wiedzy?
- Czy doktorantka dysponuje umiejętnością przygotowania opracowania naukowego w formie pisemnej?

Ocena wiedzy doktorantki w dziedzinie w jakiej prowadziła prace badawcze

Mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek zawarła w rozprawie wprowadzenie, w którym przedstawiła w zwartej formie podstawowe informacje o biologii nowotworów, leczeniu chorób nowotworowych, w szczególności raka okrężnicy, o oporności wielolekowej komórek nowotworowych i o nośnikach (głównie liposomalnych) leków przeciwnowotworowych.

Część teoretyczna odnosi się więc ściśle do badań własnych autorki. Jakości obszernych jej fragmentów dotyczących biologii nowotworów, stosowanych substancji czynnych, postaci leków ich metabolizmu wewnątrzkomórkowego oraz aktualnych sposobów leczenia nie potrafię ocenić w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie. Mogę jednak z pełnym przekonaniem stwierdzić, że przedstawione opisy tworzą obraz spójny, bez wewnętrznych sprzeczności interesujący dla niespecjalisty w obszarze biologii, który prowadzi badania w zakresie materiałów polimerowych do wytwarzania nośników leków i z tego względu dysponuje pewną wiedzą w tej dziedzinie.

Fragment części teoretycznej, jaki doktorantka poświęciła nanonośnikom stosowanym w leczeniu chorób nowotworowych jest stosunkowo krótki. Doktorantce udało się jednak w zwartej formie omówić najważniejsze aspekty wspomnianego zagadnienia. Przedstawione zostały najważniejsze i najnowsze układy lek-polimer, w tym nośniki zbudowane z polimerów termoczułych, dendrymerów i z organicznych struktur powstających wskutek samoorganizacji cząsteczek. Pani mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek nie zapomniała również o nanocząstkach magnetycznych zawierających komponenty nieorganiczne i o innych nanocząstkach nieorganicznych przydatnych zarówno w terapii jak i w diagnostyce (obszar tak zwanej teranostyki przyciągającej uwagę zarówno badaczy prowadzących prace podstawowe jak i praktyków). Szczególną uwagę doktorantka poświęciła liposomom

omawiając sposoby ich otrzymywania, najważniejsze właściwości i sposoby zastosowania w medycynie.

Po przeczytaniu części teoretycznej z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że doktorantka dysponuje ugruntowaną wiedzą w dziedzinie jakiej dotyczy rozprawa doktorska. Ta część, po nadaniu jej odpowiedniej formy wymaganej przez wybrane czasopismo, może być opublikowana z korzyścią dla czytelników spośród lekarzy i specjalistów w zakresie materiałów stosowanych w medycynie. Dla wielu czytelników może być ona inspiracją. W wypadku recenzenta stanowi dobre uzasadnienie celowości badań podjętych przez doktorantkę.

Rozwój wiedzy będący wynikiem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Zadanie jakie postawiła przed sobą pani mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek było bardzo konkretne i jasno zdefiniowane. Stanowiło je zaprojektowanie i otrzymanie liposomów spełniających jednocześnie kilka ważnych warunków. Powinny być one zbudowane z materiałów biozgodnych, dobranych tak, aby nie powodowały niekontrolowanych, niepożądanych reakcji organizmu, zawierać substancję aktywną o działaniu przeciwnowotworowym oraz dodatkowe komponenty pomagające liposomom na preferencyjne wiązanie się z błoną komórkową komórek nowotworowych oraz ograniczające mechanizmy komórkowe prowadzące do usuwania leku z ich wnętrza, a tym samym do bardzo kłopotliwej lekooporności.

Metody badawcze i opisy przeprowadzanych doświadczeń

Podczas realizacji badań mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek syntetyzowała makrocząsteczki o zaplanowanej strukturze łącząc składające się na nie fragmenty (poli(glikol etylenowy)-bis-(amina), kwas foliowy, 1,2-distearoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamine, bezwodnik kwasu bursztynowego) z wykorzystaniem dobrze poznanych reakcji biegnących z udziałem karbodiimidu. Ten etap pracy miał charakter inżynierii molekularnej, gdy elementem nowości nie są poszczególne reakcje chemiczne a przeprowadzenie ich odpowiedniej sekwencji prowadzącej do zaplanowanych związków. Kolejne etapy pracy polegały na wytworzeniu z tych związków liposomów (również stosując znane metody) zawierające 5-fluorouracyl i itrakonazol lub kalceinę oraz zbadanie właściwości

fizykochemicznych uzyskanych struktur. Do badań otrzymywanych polimerów i nośników liposomowych pani mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek wykorzystwała wiele nowoczesnych technik badawczych związanych z reakcjami na polimerach, wytwarzaniem liposomów i określaniem ich właściwości oraz właściwości ich elementów składowych (np. biwarstwy oddzielającej wewnątrz liposomów od otoczenia).

Obejmowały one spektroskopie ^1H NMR, IR, UV-VIS, i spektroskopię fluorescencyjną, mikroskopie AFM i BAM (Brewster angle microscopy), DLS (dynamic light scattering), DSC (differential scanning calorimetry), wagę Langmuira. Pomocniczą, lecz bardzo istotną rolę odgrywało modelowanie komputerowe z wykorzystaniem metod dynamiki molekularnej.

W badaniach biologicznych związków nieenkapsulowanych i enkapsulowanych w liposomach doktorantka stosowała znane i sprawdzone techniki i metody analityczne, w tym cytometrię, PCR, test MTT oraz metody obrazowania lokalizacji materiału transportowanego przez liposomy do poszczególnych organów, z wykorzystaniem w tym celu znaczników fluorescencyjnych.

Rozprawa zawiera szczegółowe opisy przeprowadzanych doświadczeń oraz wystarczające informacje o stosowanych odczynnikach i materiałach. Czytelnicy będą mogli z nich korzystać do planowania własnych prac.

Wszystkie doświadczenia i pomiary analityczne przeprowadzono w sposób przemyślany. W pracy nie ma doświadczeń niepotrzebnych. Każde było niezbędne na drodze do celu zasadniczego.

Podczas czytania pracy zwrócił moja uwagę brak analiz chromatograficznych, które moim zdaniem powinny być zastosowane do analizy związków otrzymywanych na poszczególnych etapach syntezy. Nie wiem, dlaczego doktorantka uznała za wystarczającą identyfikację produktów reakcji z wykorzystaniem ^1H NMR i IR, które w chemii związków wielocząsteczkowych z trudem można wykorzystać do wykazania, że „widziane” ugrupowania są związane kowalencyjnie w ramach tej samej makrocząsteczki.

Mimo wspomnianych wątpliwość uważam, że sposób przeprowadzenia doświadczeń i opracowania ich wyników zasługują na uznanie.

Jakość interpretacji uzyskanych wyników

Co do prawidłowości interpretacji wyników przeprowadzonych doświadczeń nie mam wątpliwości. Wspomniane przeze mnie badania chromatograficzne dostarczyłyby uzupełniających informacji o czystości syntetyzowanych produktów (w niektórych wypadkach sama doktorantka przypuszcza, że mogą one zawierać zanieczyszczenia). Z pełnym przeświadczeniem stwierdzam, że wszystkie istotne wnioski przedstawione w pracy mają mocne podstawy w przeprowadzonych doświadczeniach.

Umiejętności przygotowania opracowania naukowego w formie pisemnej

Materiał zawarty w rozprawie został bardzo dobrze przygotowany i ułożony w spójną i logiczną całość. Poszczególne fragmenty stanowią konsekwentną kontynuację tych, które je poprzedzają. Rysunki, schematy i fotografie są czytelne, o właściwych wymiarach i bardzo dobrej jakości. Kolory na wykresach i fotografiach stosowane są rozważnie, w sposób celowy. Służą koncentrowaniu uwagi czytelnika na omawianych zagadnieniach. Wykaz skrótów umieszczonych na początku rozprawy stanowi istotną pomoc podczas jej czytania.

Praca została napisana poprawnym językiem, starannie zredagowana. Oczywiście, w liczącym ponad 160 stron tekście można znaleźć drobne uchybienia, lecz są one na tyle mało istotne, że w recenzji nie zamierzam poświęcać im miejsca.

Nieco zdziwiło mnie tylko umieszczenie streszczeń, w języku polskim i angielskim, na końcu, zaraz po podsumowaniu i wnioskach. Bowiem czytelnik po przeczytaniu rozprawy raczej nie potrzebuje streszczenia. Co innego, gdy znajduje się ono na początku i stanowi zapowiedź tego czego czytelnik może spodziewać się w zasadniczej części pracy.

Dorobek naukowy

Znajdując się jeszcze na początkowym etapie kariery naukowej pani mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek ma w swoim dorobku trzy publikacje, które ukazały się drukiem, oraz czternaście prezentacji na konferencjach krajowych i zagranicznych (w tym dwie prezentacje ustne). Uwzględniając czas w jakim zrealizowała badania uważam, że jest to dorobek znaczny.

Podsumowanie

Pragnę podkreślić, że mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek zdobyła doświadczenie za granicą, podczas staży w *Research Institute of Materials Science and Engineering*, Mar de la Plata, Argentyna i w firmie *CIC bioGUNE (Centre for cooperative Research in Biosciences)*, Derio, Hiszpania.

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr lek. med. Monika Dzieciuch-Rojek spełnia wszystkie niezbędne warunki określone przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003 z późniejszymi uzupełnieniami a ponadto jest rozprawą, która zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie mgr lek. med. Moniki Dzieciuch-Rojek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W wypadku, jeśli zostaną spełnione pozostałe wymagania określone przez Wysoką Radę, będę głosował za wyróżnieniem pracy.

Łódź, 29 listopada 2015

