CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH
Polskiej Akademii Nauk
Dział Polimerów

ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
Profesor dr hab. Stanisław Słomkowski

Telefon: (42)-680-3253 **Fax: (42)-680-3261** **E-mail: staslomk@cbmm.lodz.pl**

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Katarzyny Kłysik-Trzciańskiej

wykonanej na Uniwersytecie Jagiellońskim

w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów
Zakładu Chemii Fizycznej i Elektrochemii Wydziału Chemii UJ

oraz

w Zespole Wirusologii
Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ

Nowe polielektrolitowe inhibitory wirusa HSV-1

Recenzowana rozprawa została poświęcona opracowaniu nowych układów, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób spowodowanych zakażeniem wirusem opryszczki pospolitej (Herpes simplex) typu I (HSV-1). Obejmowała zarówno badania nowych nośników polimerowych w postaci mikrosfer oraz folii zawierających znany i stosowany obecnie lek acyklowir jak również polielektrolitów, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, w tym jonowych pochodnych polimerów niejonowych, w wypadku których spodziewano się właściwości przeciwwirusowych. Praca dotyczyła zarówno polimerów, które same nie miały właściwości przeciwwirusowych a pełniły funkcję nośnika właściwej substancji biologicznie czynnej jak również polimerów bioaktywnych. Należy zauważyć, że poza naturalnymi związkami wielkocząsteczkowymi (kwasy nukleinowe, oligonukleotydy, białka, peptydy, niektóre polisacharydy) niewiele polimerów ma właściwości, które pozwalałyby je stosować jako leki. Badania, jakie podjęła doktorantka, były bardzo ważne, ambitne i niełatwe. Ich waga wynika z często bagatelizowanych zagrożeń spowodowanych zakażeniami wirusem opryszczki. Ponadto, poszukiwania odpowiedzi na postawione pytania wymagało zastosowania metod z zakresu dwóch różnych dziedzin – chemii i biochemii, co powodowało konieczność zdobycia przez doktorantkę wiedzy o warsztacie doświadczalnym i intelektualnym w wyjątkowo szerokim zakresie.

Nie umiem odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu los a w jakim świadome wybory kierowały mgr Katarzyną Kłysik-Trzciańską, jest jednak pewne, że znalazła się ona w otoczeniu wyjątkowo sprzyjającym prowadzeniu prac badawczych na pograniczu wymienionych dziedzin. Prof. dr hab. Maria Nowakowska jest wybitnym, uczonym znanym na świecie, o ogromnym doświadczeniu i dorobku naukowym. W zasadzie cały Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów stanowił dla doktorantki niezwykle inspirujące środowisko. Prof. dr hab. Krzysztof Pyrć ma niezwykle wartościowe osiągnięcia w zakresie badań struktury i oddziaływań wirusów na poziomie molekularnym. Oba zespoły dysponowały wyposażeniem komplementarnym, biorąc pod uwagę potrzeby przedsięwzięcia realizowanego przez doktorantkę. Badania prowadzone przez doktorantkę wspomagało wsparcie ze strony NCN i uczelni w ramach projektu Opus, realizowanego przez prof. dr hab. Marię Nowakowską, i uczelnianego Funduszu Projektów Doktoranckich. Już w tym miejscu chciałbym podkreślić, że mgr Katarzyną Kłysik-Trzciańską bardzo dobrze wspomniane wyżej możliwości wykorzystała.

W dalszej, zasadniczej części recenzji postaram się przedstawić odpowiedzi na następujące pytania:

- Czy doktorantka potrafiła prawidłowo opisać przeprowadzone badania i przedstawić ich wyniki w formie naukowego opracowania?
- Czy dysponuje aktualna wiedzą w zakresie prowadzonych badań dotyczących rozprawy?
- Czy w zostały zastosowane właściwe metody badawcze oraz czy opisy doświadczeń są prawidłowe i wystarczające?
- Czy badania odprowadziły do rozwoju wiedzy w obszarze tematyki doktoratu?
- Czy interpretacja uzyskanych wyników odpowiada aktualnemu stanowi wiedzy?

Umiejętności przygotowania opracowania naukowego w formie pisemnej

Rozprawa doktorska ma formę klasyczną. Po stronie tytułowej i stronach zawierających podziękowania pani mgr Katarzyną Kłysik-Trzciańskąumieściła przejrzysty i szczegółowy spis treści. Po nim doktorantka umieściła przydatny wykaz stosowanych oznaczeń i skrótów. Po nim spis rysunków i tabel wraz z numerami stron, na których się one znajdują. Te spisy są niezwykle użyteczne pomagając odnaleźć rysunki i tabele w tekście rozprawy. W dalszej

części rozprawy znajdują się streszczenia w językach polskim i angielskim. Są one zwarte i zawierają najważniejsze informacje o badaniach przeprowadzonych podczas realizacji pracy doktorskiej. Kolejną część stanowi zwięzłe wprowadzenie, w którym doktorantka przedstawiła uzasadnienie wyboru tematyki pracy i jej konkretne cele.

Bardzo ważnym elementem rozprawy jest jej część nazwana przed doktorantkę częścią teoretyczną. Fragment o takim tytule zawiera wiele rozpraw doktorskich, choć w większości wypadków jest to tytuł niewłaściwy, bowiem niezmiernie rzadko ta część zawiera opis jakiejkolwiek teorii. W recenzowanej pracy znacznie lepiej byłoby nazwać tę część krótkim podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy o wirusie HSV-1, sposobach zakażenia, chorobach jakie wywołuje, lekach (biorąc pod uwagę substancję czynną jak i postać leku) jak i o metodach leczenia. Przedstawienie zagadnień mieszczących się w tak szerokim zakresie na niewielu stronach (część teoretyczna liczy 43 strony) w sposób wyważony i możliwie wyczerpujący mogło wydawać się zadaniem niemożliwym. Pragnę podkreślić, że doktorantka poradziła z nim sobie lepiej niż oczekiwałem. Oczywiście, nie udało się jej uniknąć pewnych uproszczeń, jednak całość została bardzo dobrze napisana i czytelnik może wynieść wiele korzyści z jej przeczytania. Byłaby jeszcze lepsza, gdyby pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska uwypukliła w niej wady obecnie stosowanych nośników leków przeciw wirusowi HSV-1, które uzasadniałyby potrzebę poszukiwania nowych układów.

W części teoretycznej zwraca uwagę niezwykle obszerna literatura, licząca 271 pozycji, stanowiąca jej podstawę. W dużej części są to prace z ostatnich dziesięciu lat. Gdy było to celowe, doktorantka korzystała również z prac starszych. W rezultacie powstało opracowanie bardzo użyteczne dla innych członków zespołów badawczych, w których praca doktorska została wykonana. Zaletą części teoretycznej jest również jasny sposób prezentacji i styl, który powoduje, że pracę „dobrze się czyta".

Bardzo dobrze, została napisana również część doświadczalna. Zawiera zwięzłe opisy używanych urządzeń i aparatów oraz opisy pomiarów idoświadczeń wystarczająco szczegółowe aby można je powtórzyć w innych laboratoriach. Dyskusja wyników nie stanowi oddzielnej części rozprawy a przedstawiona została na zakończenie każdej grupy syntez, pomiarów charakteryzujących poszczególne formy związków bioaktywnych i doświadczeń opisujących ich oddziaływania z komórkami. Niezwykla liczne i bardzo dobrze wykonane rysunki (107) oraz czytelne tabele (36) pełnią w tej pracy bardzo ważną funkcję.

Praca została przygotowana starannie. Nieliczne błędy redakcyjne nie sprawiaja kłopotu podczas czytania.

Ocena wiedzy doktorantki w dziedzinie w jakiej prowadziła prace badawcze

Ocenę wiedzy pani mgr Katarzyny Kłysik-Trzciańskiej mogę dokonać między innymi podstawie przygotowanej przez nią części teoretycznej, która, jak wspominałem, liczy 43 strony. Przede wszystkim jest to wiedza bardzo szeroka. Odnosi się co prawda tylko do grupy zagadnień związanych z wirusem HSV-1, jednak dotyczy problemów związanych z różnymi dziedzinami. Doktorantka dysponuje wiedzą dotyczącą budowy wirusa i procesów zakażenia i funkcjonowania w organizmie gospodarza, w tym przenikania do komórek, ekspresji genów wirusowych, wytwarzania w komórkach elementów składowych wirusów, pakowania DNA wirusa do kapsydów oraz transport wirusów na zewnątrz komórek. Doktorantka wie o zakażeniach skutkujących pozostawaniem wirusów w stanie utajonym. W zakresie chemii zdobyła wiedzę o budowie leków hamujących proliferację wirusa HSV-1 i o mechanizmach chemicznych blokujących jej poszczególne etapy. Dysponuje wiedzą o różnych nośnikacg przeciwwirusowych substancji bioaktywnych i o systemach ich kontrolowanego dostarczania do wybranych organów.

Dobór i umiejętność wykorzystania różnych rodzajów aparatury analitycznej i przeprowadzenia analizy wyników, które ocenię dokładniej w dalszej części recenzji świadczą o bardzo dobrej wiedzy doktorantki o obecnie stosowanych metodach w zakresie chemii materiałowej, w obszarze farmacji i w badaniach mikrobiologicznych.

Biorąc pod uwagę jakość analizy badań własnych przeprowadzonych przez doktorantkę nie mam wątpliwości, że dysponuje ona ugruntowaną i obszerna wiedzą w dziedzinie, jakiej dotyczy rozprawa. W szczególności, powyższe stwierdzenie odnosi się do wiedzy w zakresie budowy i właściwości zarówno nośników leków przeciwwirusowych jak i polimerów, w szczególności polielektrolitów, o włościach bioaktywnych.

Metody badawcze i opisy przeprowadzanych doświadczeń

Podczas realizacji zaplanowanego cyklu prac pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska przeprowadziła cykl różnych reakcji modyfikacji wybranych polimerów naturalnych. Prace te obejmowały modyfikację alginianu sodu skutkującą wprowadzeniem do tego polimeru ugrupowań cytozynowych, modyfikację dekstranu i hydroksypropylocelulozy prowadzące do otrzymania polikationowych pochodnych tych polimerów, modyfikację dekstranu z wykorzystaniem argininy i szczepienia kopolimerów zawierających poli(tlenek etylenu). Otrzymywała także polijonowe pochodne polimerów syntetycznych, wśród nich kationowo modyfikowanego poli(chlorowodorku aliloaminy) oraz polianionowych kopolimerów styrenu

i styrenosulfonianu sodu. Istotną część pracy doktorantka poświęciła syntezie i badaniom właściwości kopolimerów blokowych zawierających blok poli(tlenku etylenu) i kationowy blok poli(chlorku(3-metakryloiloamino)propylo)trimetyloamoniowego). Otrzymała również pochodne wspomnianych wyżej polimerów znakowane fluoroforami. Ta część pracy wykazała umiejętnne wykorzystanie przez doktorantkę metod „inżynierii molekularnej" do syntezy polimerów o zaplanowanej budowie. Syntetyzowane polimery pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska charakteryzowała stosując liczne, właściwie dobierane metody analityczne. W ich skład wchodziły spektroskopia ^{1}H i ^{13}C NMR, spektroskopia UV-Vis i IR, analiza elementarna oraz miareczkowanie konduktometryczne. Do analizy polimerów doktorantka stosowała również chromatografię żelową (GPC). Metoda GPC niezbyt nadaje się jednak do badań polijionów, klasy polimerów, które były głównym obiektem zainteresowań doktorantki. Z tego względu wykorzystanie tej techniki w badaniach, jakie obejmował doktorat, miało bardzo ograniczony zakres i dotyczyło polimerów niejonowych.

Otrzymywane polimery doktorantka stosowała do wytwarzania mikrosferowych nośników acyklowiru, leku stosowanego przeciw wirusowi HSV-1. Niektóre z nich wykorzystywała do badań oddziaływań polimerów z wirusami jak również w badaniach aktywności przeciwwirusowej otrzymywanych układów polimerowych. Do wytwarzania mikrosfer z mieszaniny alginianu sodu modyfikowanego przez przyłączenie grup cytozynowych oraz niemodyfikowanego alginianu sodu lyb hydroxypropylocelulozy doktorantka wykorzystała metodę ekstruzji roztworów polimerów do roztworu zawierającego czynnik sieciujący – jony Ca^{2+}. Jest to metoda prosta, umożliwiająca otrzymywanie mikrosfer stosunkowo jednorodnych w dużym zakresie średnic. Prosty układ ekstruzyjny wykorzystany przez doktorantkę pozwolił jej jednak na wytwarzanie mikrosfer o średnicach dużych (około 500 μm). Nie mam jednak wątpliwości, że użycie ekstruderów o mniejszych średnicach dysz, umożliwi wytwarzanie mniejszych mikrosfery. Pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska przeprowadziła również badania oddziaływań kopolimerów blokowych zawierających bloki polikationowe z siarczanem heparanu w celu sprawdzenia możliwości wykorzystania wspomnianych wyżej kopolimerów blokowych do blokowania receptorów zawierających 3-O-sulfonowany siarczan heparanu. Do badań poza spektrofotometrią UV-Vis i miareczkowaniem konduktometrycznum doktorantka wykorzystała mikrokalorymetrię pozwalającą na wyznaczenie parametrów termodynamicznych tych oddziaływań. W badaniach tworzenia kompleksów oraz agregatów z udziałem kopolimerów blokowych zawierających blok poli(tlenku etylenu) i blok kationowy poli(chlorku(3-metakryloiloamino)propylo)trimetylo-amoniowego) doktorantka stosowała metodę dynamicznego rozproszenia światła umożliwiającą nie tylko wykrywać powstawanie

nanocząstek polimerowych i agregatów kopolimerów z cząstkami wirusa HSV-1, lecz także oznaczanie ich wielkości i właściwości elektrokinetycznych (potencjał zeta).

Rozprawa doktorska zawiera również wyniki badań biochemicznych, w szczególności testów określających cytotoksyczność badanych polimerów i ich aktywność przeciwwirusową. W pracy wykorzystano również mikroskopię konfokalną do ilustracji aktywności przeciwwirusowej badanych układów polimerowych na drodze obserwacji zainfekowanych komórek w obecności lub bez bioaktywnych polimerów. Z treści pracy nie mogłem się zorientować, czy badania te doktorantka wykonała sama, czy też przeprowadzili je dla niej współpracujący biochemicy i biolodzy (opisy doświadczeń zostały przedstawione w formie bezosobowej). Nie mam jednak wątpliwości, że w pełni rozumiała ona znaczenie uzyskiwanych wyników i wykorzystywała je w sposób świadomy.

W swojej pracy doktorskiej pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska wykonała ogromną pracę przeprowadzając wiele syntez, innych eksperymentów oraz pomarów. Sposób przedstawienia wyników badań wyraźnie świadczy o jej szerokiej wiedzy w tym zakresie.

Do prezentacji wyników mam jednak niewielką lez istotną uwagę. W bardzo wielu wypadkach wyniki pomiarów i oznaczę przestawione zostały w sposób sugerujący nieprawdopodobna dokładność. Konieczne jest stosowanie zaokrągleń. Na przykład, poza spektrometrią mas nie znam technik umożliwiających pomiar mas molowych z dokładnością do pięciu miejsc znaczących. Niewłaściwe jest również podawanie wartości błędu oznaczenia z dokładnością większą niż sam błąd.

Rozwój wiedzy będący wynikiem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska została poświęcona poszukiwaniom różnych form układów stwarzających nadzieję na zastosowania, jako inhibitorów infekcji wirusem opryszczki zwyczajnej HSV-1. Podczas swojej pracy pani mgr Katarzyna Kłysik-Trzciańska zbadała dużą liczbę układów polimerowych. Wyniki niektórych badań są bardzo obiecujące, innych mniej. Lecz i tych bym nie przekreślał. Najciekawsza i moim zdaniem najważniejsza jest część rozprawy dotycząca hamowania replikacji wirusa przy zastosowaniu kationowo modyfikowanego dekstranu i kopolimeru blokowego zawierającego oprócz bloku poli(tlenku etylenu) blok kationowy poli(chlorku(3-metakryloiloamino)propylo)trimetyloamoniowego). Oba polimery charakteryzują się działaniem hamującym replikację wirusa HSV-1. Ostatni z nich okazał się szczególnie interesujący ze względu na nietoksyczność i wysoką aktywność przeciwwirusową. Pragnę podkreślić, że poza białkami, peptydami oraz oligo- i

wielkocząsteczkowymi kwasami nukleinowymi nieznane są polimery, w szczególności syntetyczne, stosowane jako substancje czynne leków.

W badaniach dotyczących wykorzystania polimerowych nośników acyklowiru doktorantka uzyskała obiecujące wyniki w wypadku żeli. Natomiast niepowodzeniem zakończyły się prace dotyczące nośników mikrosferowych. Acyklowir zbyt szybko uwalniał się z tych cząstek. Zastosowanie polimerów z podstawnikami cytozynowymi (kompleksującymi acyklovir wskutek wiązań wodorowych) do wytwarzania nośników mikrosferowych uważam jednak za pomysł dobry i wart dalszej pracy.

Jakość interpretacji uzyskanych wyników

Uważam, że interpretacja wyników badań przedstawionych w rozprawie w pełni odpowiada obecnej wiedzy w dziedzinie, jakiej doktorat dotyczy i nie mam uwag krytycznych do formułowanych przez doktorantkę wniosków.

Dorobek naukowy

Na dorobek publikacyjny pani mgr Katarzyny Kłysik-Trzciańskiej składa się pięć prac, z których cztery są ściśle związane z pracą dokrską. Biorąc pod uwagę, że powstały one w krótkim czasie, w jakim rozwijała się dotychczasowa kariera naukowa doktorantki, uważam ten dorobek z duży.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Kłysik-Trzciańskiej 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.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie pani mgr Katarzyny Kłysik-Trzciańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę przedstawione w recenzji wysokie oceny wszystkich elementów rozprawy i traktując je jako uzasadnienie wnioskuje o wyróżnienie pracy.

Łódź, 18 listopada 2019