



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 Urszuli Kwolek

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Pęcherzykowe struktury polimerowe oraz oddziaływania polimerów z membranami lipidowymi

Recenzowana praca dotyczy bardzo ważnych zagadnień związanych z stosowanymi w medycynie nośnikami związków biologicznie czynnych. Wśród nich niezwykle ważne są problemy dotyczące oddziaływań polijonów z błonami komórkowymi. Badania w tej dziedzinie mogą pomóc w opracowaniu praktycznie użytecznych metod leczenia z zastosowaniem terapii genowej. Praca została wykonana pod opieką dr. hab. Mariusza Kępczyńskiego, profesora Uniwersytetu Jagiellońskiego, w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów Zakładu Chemii Fizycznej i Elektorchemii Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego. W zespole tym, kierowanym przez prof. dr hab. Marię Nowakowską, od lat prowadzone są badania w dziedzinie mało- i wielkocząsteczkowych nośników związków bioaktywnych, enzymów i katalizatorów. Praca ma charakter badań podstawowych. Jej wyniki będą jednak bardzo pomocne podczas projektowania nowych form leków umożliwiających bezpośrednie dostarczanie substancji czynnych, w szczególności kwasów nukleinowych, do wnętrza komórek.

Jako obiekty swoich badań doktorantka i jej opiekun wybrali liposomy wytwarzane z 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfatydylocholiny (DPPC) i 1,2-dioleilo-*sn*-glicero-3-fosforanu sodu (DOPA), polietylenoiminy, liniową i rozgałęzioną, ich pochodne zawierające kationy

amoniowe, a także kwas hialuronowy i jego modyfikowane formy. Wymienione lipidy były wykorzystane do wytwarzania warstw, które stanowią modele błony komórkowej. Przeprowadzono ponadto badania właściwości polimerosomów, analogów liposomów. Otrzymywano je z kopolimerów zwitterjonowych - poli(2-(metakryloilooksy)etylofosforylocholina)-*b*-poli((chlorok (3-(metakryloiloamino)propylo)trimetyloamoniowy)) (PMPC₂₀-*b*-PMAPTAC₉₀) oraz anionowych poli(2-(metakryloilooksy)etylofosforylocholina)-*b*-poli(2-(akryloamido)-2-metylopropanosiarczan sodu) (PMPC₂₀-*b*-PAMPS₁₉₆). Poszczególne grupy doświadczeń zaplanowane w ramach badań stanowiących podstawę doktoratu uzupełniają się wzajemnie i stwarzają warunki do uzyskania pełnego opisu.

Na komplet badań składają się przede wszystkim prace wykonane przez samą doktorantkę. Obejmują one wytwarzanie monowarstw modelujących powłoki liposomów, fizykochemiczne badania ich struktury w zależności od rodzaju i udziału wybranych lipidów (w wypadku liposomów z mieszanin lipidów), poznanie procesów towarzyszących przemianom struktury membran podczas zmian temperatury, zależności wielkości i rozrzutów wielkości oraz stabilności liposomów od pH i obecności innych cząsteczek, stabilności zawiesin liposomów przy różnych stężeniach polimerów jonowych i jonogennych (poliiminy, kwas hialuronowy i ich pochodne). Wspomniane wyżej badania były uzupełnione pracami z wykorzystaniem modelowania komputerowego, oraz badaniami oddziaływań liposomów i polimerosomów z żywymi komórkami. Doktorantka wyraźnie zaznaczyła, które z omawianych prac przeprowadzonych w innych zespołach, zostały włączone do rozprawy w celu zapewnienia kompletności opisu.

Przygotowując ocenę rozprawy staram się odpowiedzieć na następujące pytania:

- Czy doktorantka potrafi prawidłowo opisać przeprowadzone badania i przedstawić ich wyniki w formie naukowego opracowania?
- Czy 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?

Umiejętności przygotowania opracowania naukowego w formie pisemnej

Tekst rozprawy został ułożony w sposób klasyczny. Zasadniczą jej część poprzedzają: bardzo pomocny wykaz skrótów i oznaczeń stosowanych w rozprawie oraz spis treści. Rozpoczyna ją krótkie, dwustronicowe wprowadzenie i jasno przedstawiony cel badań. Po nich pani mgr Urszula Kwolek umieściła część teoretyczną. Rozdział o tym tytule zawiera prezentację aktualnej wiedzy o obiektach, związkach, procesach i metodach badań doświadczalnych, również o doświadczeniach komputerowych, oraz o metodach wykorzystywanych do analizy wyników. Kolejny rozdział stanowi część doświadczalna, której podrozdziały zawierają opisy przygotowania i przeprowadzenia poszczególnych grup eksperymentów, analizy wyników i wnioski. Opis badań własnych kończy krótkie podsumowanie. Rozprawę zamykają: streszczenia w językach polskim i angielskim, bibliografia i spis publikacji współautorstwa doktorantki. Praca została napisana poprawnym językiem, jest ilustrowana starannie przygotowanymi wykresami, schematami i fotografiami. Redakcyjne niedostatki są rzadkie. Na przykład, na rysunku 54, na wykresie przedstawiającym rozkład średnic polimerosomów błędnie opisano oś odciętych (jednostki μm zamiast w nm). Takie uchybienia są jednak nieliczne i nie stwarzają kłopotu podczas czytania rozprawy.

Miałem już przyjemność oceniać wcześniej pracę doktorską wykonaną na Wydziale Chemii UJ. Zarówno w tamtej pracy jak i w obecnej streszczenia zostały umieszczone na końcu rozprawy. Nadal dziwi mnie ten zwyczaj, bo po przeczytaniu rozprawy czytelnik odniesie niewielką korzyść z przeczytania jej streszczenia.

Ocena wiedzy doktorantki w dziedzinie w jakiej prowadziła prace badawcze

Rozprawa zawiera liczącą 35 stron część teoretyczną. W części tej pani mgr Urszula Kwolek przedstawiła w bardzo zwarty sposób aktualny stan wiedzy o budowie błon biologicznych i o ich modelach, zarówno w odniesieniu do struktury jak i dynamiki tych obiektów, o polimerach, których oddziaływania z błonami komórkowymi są ważne dla zrozumienia procesów związanych z podawaniem leków w postaci klasycznych liposomów i polimerosomów oraz o strukturach polikationowych użytecznych do dokomórkowego transportu kwasów nukleinowych. Podstawą tej przeglądowej części rozprawy jest ponad sto publikacji, w większości oryginalnych, w około $\frac{3}{4}$ z ostatniego dziesięciolecia. O wiedzy autorki rozprawy świadczy również wysoki poziom analizy wyników badań własnych.

Po zapoznaniu się z częścią teoretyczną oraz z analizą badań własnych i badań przeprowadzonych przez innych badaczy, które włączono do rozprawy w celu uzyskania pełnego opisu, z całkowitym przekonaniem twierdzą, że doktorantka dysponuje ugruntowaną wiedzą w zakresie dziedziny, jakiej dotyczy rozprawa doktorska. Czytając rozprawę nabrałem przekonania, że doktorantka ma również dużą wiedzę o modelowaniu komputerowym oraz o badaniach biologicznych, umożliwiającą jej właściwe korzystanie z wyników jakie uzyskano w zespołach, z którymi współpracowała.

Sądzę, że część teoretyczna w obecnej formie, nie mogłaby zostać opublikowana jako praca przeglądowa. Omówiono w niej przedstawiane zagadnienia nieco fragmentarycznie. Nie uważam jednak tego za wadę. Celem pani mgr. Kwolek nie było, jak sądzę, przygotowanie kompletnej pracy przeglądowej a przedstawienie podstaw przydatnych czytelnikowi podczas czytania części dotyczącej prac własnych. Tę funkcję część teoretyczna spełnia bardzo dobrze. Nie mam jednak wątpliwości, że na podstawie części teoretycznej i zebranej literatury można przygotować manuskrypt wartościowej pracy przeglądowej.

Rozwój wiedzy będący wynikiem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Pytania, na jakie pani mgr Urszula Kwolek zamierzała znaleźć odpowiedź, zostały jasno określone i uzasadnione obecnym stanem wiedzy, a w istocie niedostatkami obecnego opisu i zrozumienia ważnych problemów odnoszących się do mechanizmów powstawania, struktury i właściwości liposomów i polimerosomów. Dotychczasowe badania w większości wypadków dotyczyły liposomów zbudowanych z jednego rodzaju lipidów. Takie mono- i di-warstwy lipidowe są elementami prostych i użytecznych nośników związków biologicznie czynnych. Stanowią jednak modele bardzo odległe od rzeczywistych struktur tworzących błony komórek i istniejących w komórkach organelli. Badania przeprowadzone przez doktorantkę dotyczące liposomów zbudowanych z lipidów z głowami anionowymi (DOPA) i zwitterjonowymi (DPPC) pozwoliły na poznanie struktury membran bardziej złożonych. Bardzo ważne w tym wypadku było znalezienie odpowiedzi na pytanie dotyczące jednorodności/niejednorodności rozmieszczenia wspomnianych wyżej lipidów w membranach. Połączenie badań mikrokalorymetrycznych, oznaczeń średniej powierzchni membrany przypadającej na jedną cząsteczkę lipidu i modelowania komputerowego pozwoliło na stwierdzenie, że cząsteczki lipidu anionowego (DOPA) rozmieszczone są stosunkowo izotropowo wskutek przeważających hetero-oddziaływań. Wyjaśniono również w jakich warunkach (temperatura) segmenty węglowodorowe są nieuporządkowane w sposób charakterystyczny dla fazy ciekłej,

a w jakich ich niemal wyprostowane łańcuchy organizują się w domeny o wyższym stopniu uporządkowania, typowym dla fazy żelowej. Drugi ważny wniosek wynikający z badań przeprowadzonych przez doktorantkę dotyczył oddziaływań polietylenoiminy, liniowej i rozgałęzionej, z membranami zawierającymi cząsteczki lipidów z głowami anionowymi i zwitterjonowymi. Okazało się, że cząsteczki PEI nie tylko adsorbują się na powierzchni membrany, lecz również modyfikują jej lokalny skład. Takie lokalne zaburzenie może przemieszczać się wraz z przemieszczającą się po powierzchni cząsteczką polietylenoiminy. Istotnym było również zaobserwowanie wnikania segmentów polietylenoiminy do warstwy lipidowej. Takie procesy mogą sugerować mechanizm cytotoksycznego działania polietylenoiminy polegający na naruszeniu integralności membrany komórkowej. Powyższe wyniki badań uważam za najciekawsze i szczególnie ważne. Praca zawiera jednak wiele innych również interesujących wyników. Dotyczą one, między innymi, modyfikacji kwasu hialuronowego polegającej na wprowadzeniu pewnej liczby grup kationogennych grup aminowych pozwalającej na efektywną adsorpcję tego polimeru na anionowych liposomach, zapewniającej ich stabilizację, jak również otwierającej możliwości opłaszczania komórek a także wyjaśnienia roli struktury topologicznej polietylenoiminy (liniowa/rozgałęziona) w stabilizacji/destabilizacji koloidalnej ujemnie naładowanych liposomów. Badania, w których doktorantka wykazała, że otrzymywane liposomy o jonowo-zwitterjonowych membranach są stabilne w różnych temperaturach, w stosunkowo szerokim zakresie pH, w obecności niejonowych środków powierzchniowo czynnych a także białek surowicy oraz pokazanie, że można w nich enkapsulować różne związki i substancje mają być może mniejsze znaczenie poznawcze, lecz są niezwykle istotne w projektowaniu praktycznie użytecznych nośników leków.

Metody badawcze i opisy przeprowadzanych doświadczeń

Realizując badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej pani mgr Urszula Kwolek stosowała wiele związków, rozpuszczalników i innych substancji dostępnych na rynku odczynników chemicznych. Niektóre z polimerów, pochodne kwasu hialuronowego oraz kopolimery użyte do wytwarzania PIC-somów, otrzymała z innych zespołów. Część syntez przeprowadziła sama. Była to, między innymi, synteza rozgałęzionej polietylenoiminy z czwartorzędowymi kationami amoniowymi. Otrzymane polimery charakteryzowała stosując spektrometrię ^1H NMR i analizę elementarną. Błony lipidowe wytwarzała korzystając z wanny Langmuira, nanosząc roztwory lipidów na ciekłą subfazę. Właściwości błon lipidowych badała stosując technikę wagi Langmuira oraz spektroskopię kąta Brewstera.

Wielowarstwowe liposomy „pierwotne” otrzymywała z uwadnianych warstw lipidowych. Finalne liposomy uzyskiwała kilkakrotnie zamrażając i rozmrażając zawiesinę liposomów „pierwotnych” a następnie ekstrudując je przez membranę o określonej wielkości i o małym rozrzucie średnic porów. W podobny sposób wytwarzała liposomy zawierające enkapsulowane wybrane związki. Polimerosomy otrzymywano na drodze samoorganizacji makrocząsteczek po zmieszaniu roztworów kopolimerów poli(2-(metakryloilooksy)etylofosforylocholina)-*b*-poli((chlerek (3-(metakryloiloamino)propylo)trimetyloamoniowy)) (PMPC₂₀-*b*-PMAPTAC₉₀) oraz poli(2-(metakryloilooksy)etylofosforylocholina)-*b*-poli(2-(akryloamido)-2-metylopropanosiarczan sodu). Kopolimery zsyntetyzowane we współpracującym zespole japońskim doktorantka charakteryzowała stosując spektroskopię ¹H NMR i chromatografię z wykluczeniem objętości (SEC). Przejścia fazowe w membranie liposomów badała stosując mikrokalorymetrię różnicową. Ważne informacje w tym zakresie można uzyskać również z pomiarów zmian grubości warstwy lipidowej naniesionej na ciekłą subfazę w w różnych temperaturach.

Do badań liposomów i polimerosomów pani mgr Urszula Kwolek stosowała również spektroskopię fluorescencyjną oraz metody mikroskopowe cryo-TEM i mikroskopię fluorescencyjną.

Istotną część badań stanowiły prace dopełniające, prowadzone w innych zespołach. W tym modelowanie komputerowe warstw lipidowych oraz badania biologiczne umożliwiające obserwację transportu dkomórkowego (mikroskopia konfokalna) oraz określenie cytotoksyczności badanych materiałów polimerowych. Prac tych, jak wspominałem, doktorantka nie wykonywała sama. Potrafiła jednak analizować otrzymywane wyniki na poziomie niezbędnym do wykorzystania ich razem z wynikami badań własnych.

Wszystkie przeprowadzone doświadczenia zaplanowano w sposób przemyślany. Czytelnik uzyskuje przekonujące wyjaśnienie, po co każde z nich było wykonywane. Opisy doświadczeń są na tyle kompletne, że osoba zainteresowana może je powtórzyć we własnym laboratorium.

Pani mgr Urszula Kwolek stosowała wiele technik eksperymentalnych. Szkoda, że do badań przejść fazowych i ruchliwości segmentalnej w membranach lipidowych nie wykorzystwała spektrometrii ¹H i ¹³C NMR. Metody te pozwalają na uzyskanie informacji dotyczącej ruchliwości poszczególnych grup atomów. Mimo to uważam, że sposób przeprowadzenia doświadczeń i opracowania ich wyników zasługują na uznanie.

Jakość interpretacji uzyskanych wyników

W odniesieniu do prawidłowości interpretacji wyników przeprowadzonych doświadczeń poza jednym przypadkiem nie mam wątpliwości. Ten jeden przypadek dotyczy oznaczenia dyspersji średnic liposomów wyznaczanej na podstawie dynamicznego rozproszenia światła, w wypadku gdy ograniczenia techniczne (zbyt duże średnice badanych obiektów przy stosowaniu techniki DLS) nie pozwalają na wyznaczenie średnic (dane z Tabeli 11 na stronie 104). Tym nie mniej, z pełnym przeświadczeniem stwierdzam, że wszystkie istotne wnioski przedstawione w pracy mają mocne podstawy w przeprowadzonych doświadczeniach.

Dorobek naukowy

Pani mgr Urszula Kwolek znajduje się na początku kariery naukowej. Na tym większe uznanie zasługuje jej dorobek naukowy opublikowany w czterech pracach w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, w tym w trzech bardzo cenionych przez światową społeczność naukową. Jest to dorobek znaczny.

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Urszuli Kwolek 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 mgr Urszuli Kwolek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 19 marca 2017

