



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30

fax: 61 854-66-39

e-mail: [syntezy@ump.edu.pl](mailto:syntezy@ump.edu.pl)

dr hab. Tomasz Gośliński, prof. UM

Poznań, dnia 3 lipca 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Oddziaływania fotosensybilizatorów makrocząsteczkowych z modelowymi dwuwarstwami lipidowymi, polimerowymi i błonami komórkowymi wybranych szczepów bakterii**

Imię i nazwisko: **mgr Ewa Rząd**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Zespół Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów, Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński**

Promotor: **Prof. dr hab. Maria Nowakowska**

Tematyka badawcza, dotycząca szeroko rozumianej chemii fotosensybilizatorów makrocząsteczkowych, ich oddziaływań z modelowymi dwuwarstwami lipidowymi, polimerowymi i błonami komórkowymi z uwzględnieniem zaawansowanych metod syntetycznych, fizykochemicznych i biologicznych, podjęta przez Panią mgr Ewę Rząd jest rozwijana z bardzo interesującymi rezultatami w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii na Wydziale Chemii pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pani Prof. dr hab. Marii Nowakowskiej. Sformułowany w temacie pracy problem badawczy dotyczący oceny **oddziaływań fotosensybilizatorów makrocząsteczkowych z modelowymi dwuwarstwami lipidowymi, polimerowymi i błonami komórkowymi wybranych szczepów bakterii** jest niezwykle ważny. Dotyka z jednej strony zagadnień poznawczych zmierzających do zrozumienia interakcji pomiędzy substancjami aktywnymi biologicznie, a błonami bakteryjnymi. Z drugiej strony zaś strony podjęte zagadnienia wykazują dużą aplikacyjność, zbliżając nas do znalezienia substancji aktywnych, umożliwiających prowadzenie efektywnej terapii fotodynamicznej ukierunkowanej przeciw mikroorganizmom. Od kilkunastu lat naukowcy i lekarze kreślą apokaliptyczną wizję dla ludzkości związaną z dramatycznym spadkiem ilości antybiotyków wykazujących skuteczność terapeutyczną. Wynika to z tego, że w minionym ćwierćwieczu mimo dużych wysiłków specjalistów wielu dziedzin i wielomiliardowych nakładów finansowych wprowadzono do terapii przeciwbakteryjnej zaledwie kilka nowych leków. Z tego względu podjęta tematyka badawcza jest bardzo aktualna, a dokonany przez Doktorantkę wybór tematu uważam za jak najbardziej uzasadniony.

Rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Rząd stanowi spójne tematycznie 166 stronicowe opracowanie, które zostało napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Zawiera wszystkie

wymagane rozdziały oraz szereg informacji uzupełniających tj. informację o finansowaniu, streszczenie w języku angielskim, spisy treści, tabel i rysunków, wprowadzenie i cele pracy, część literaturową, część doświadczalną wraz z przedstawieniem materiałów, aparatury i procedur badawczych, wyników i dyskusji, ogólne podsumowanie i wnioski, zestaw danych składających się na dorobek naukowy Doktorantki, a także bibliografię. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera szereg starannie przygotowanych rysunków i tabel, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych wyników. Piśmiennictwo liczy 104 odnośniki literaturowe, odpowiednio dobrane i pochodzące w większości z ostatnich 10 lat.

Pracę czyta się bez trudu i z przyjemnością. Doktorantka dokonała właściwego doboru tematyki do **wprowadzenia** i umiejętnie nakreśliła **cele pracy**, w których uzasadniła poszukiwanie metod terapeutycznych mogących zastąpić lub uzupełnić terapie antybiotykowe. Podkreśliła celowość opracowywania terapii, których stosowanie pozwala na uniknięcie rozwoju oporności wśród bakterii, wskazując na sens rozwijania antybakteryjnej terapii fotodynamicznej (aPDT), określanej też niekiedy jako terapia fotodynamiczna ukierunkowana przeciw mikroorganizmom (PACT). Zwróciła słusznie uwagę, że zdecydowana większość fotosensybilizatorów stosowanych w tradycyjnej terapii fotodynamicznej nie nadaje się do leczenia zakażeń bakteryjnych wywołanych przez bakterie G-. Tym samym zasygnalizowała konieczność poszukiwania fotosensybilizatorów zdolnych do pokonywania zewnętrznej błony lipidowej złożonej z lipopolisacharydów, stanowiącej ważny element budowy bakterii G-. Pani mgr Rząd nakreśliła cel pracy, którym miało być zaprojektowanie, synteza, charakterystyka fizykochemiczna nowych kationowych fotosensybilizatorów porfiryńowych wraz z oceną efektywności i mechanizmu działania w przeciwbakteryjnej terapii fotodynamicznej. Praca badawcza została podzielona na następujące etapy: (i) przyłączenie protoporfiryny IX (PpIX) do rozgałęzionych łańcuchów polietylenoiminy (PEI) o różnych masach cząsteczkowych; (ii) analiza oddziaływań otrzymanych związków z liposomami, jako układami modelowymi dla błon komórkowych/bakteryjnych; (iii) badania biologiczne z wykorzystaniem szczepów bakterii G+ i G-, w tym z użyciem biofilmu, a także fibroblastów mysich; (iv) badania porównawcze z użyciem wcześniej uzyskanych w Zespole niejonowych koniugatów porfiryń z łańcuchami poli(glikolu etylenowego) oraz anionowych koniugatów porfiryń z łańcuchami poli(kwasu metakrylowego); (v) opracowanie nanostrukturalnych nośników fotosensybilizatorów opartych na kopolimerach amfifilowych oraz micelach polimerowych celem zwiększenia efektywności dostarczania fotosensybilizatorów do komórek bakteryjnych i obniżenia toksyczności ciemnej, wraz z badaniami fizykochemicznymi oraz biologicznymi na szczepach bakterii i oceną cytotoksyczności na komórkach fibroblastów. W **części literaturowej**, w rozdziale **Terapia fotodynamiczna** Pani mgr Rząd zwróciła uwagę na ważne aspekty fizykochemiczne samej reakcji fotodynamicznej, schemat Jabłońskiego oraz rozmach, który dokonał się w ostatnich latach w opracowywaniu nowych fotosensybilizatorów. Dalej

nakreśliła temat aPDT, silnie akcentując zagadnienia chemii leków w odniesieniu do poszukiwań efektywnych fotosensybilizatorów. Następnie wyczerpująco omówiła związki, stanowiące elementy strukturalne docelowych struktur, czyli nośniki dla fotouczulaczy stosowanych w aPDT, polietyleoiminę i jej zastosowania, a także porfiryny, w tym protoporfirynę IX. Drugi obszerny rozdział Doktorantka poświęciła morfologii i fizjologii bakterii, a także patogenecie infekcji bakteryjnych, tematyce biofilmu oraz zastosowaniu aPDT względem bakterii G- i G+. Następnie Pani mgr Rząd omówiła kierunki opracowywania modeli błon biologicznych, koncentrując się na budowie liposomów i ich wytwarzaniu, modyfikacjach oraz zastosowaniach. Ostatni temat poruszony w części literaturowej dotyczył budowy, wytwarzania i zastosowań polimerosomów, bardzo nowoczesnej grupy tzw. bioinspirowanych materiałów. Należy podkreślić, że zebrany materiał literaturowy stanowi zwarte oraz bardzo kompletne kompendium. Sprawia ono, że podjęte w dalszych częściach pracy zagadnienia, część doświadczalna, wyniki i ich omówienie oraz wnioski wydają się naturalnie wpisywać w poruszane problemy. **Część doświadczalna** jest złożona z kilku niezależnych podrozdziałów autonomicznie zbierających dane eksperymentalne, wyniki i ich omówienie oraz wnioski. Omawiane badania zostały przeprowadzone wg dobrze przemyślanego schematu i obejmowały otrzymanie związków aktywnych, wraz z opracowaniem odpowiedniej formulacji, badania fizykochemiczne i biologiczne w zakresie aPDT i cytotoksyczności. Najpierw Doktorantka omówiła preparatykę nowych makrocząsteczkowych pochodnych protoporfiryny IX. Przedstawiła materiały, aparaturę i procedury badawcze oraz syntezę koniugatów PpIX z rozgałęzionymi polietyleoiminami o masach cząsteczkowych 10 kDa (PEI<sub>10</sub>) i 60 kDa (PEI<sub>60</sub>). Warto dodać, że wydajność obu procesów została dobrze zoptymalizowana i wynosiła odpowiednio 90 i 80%. Oba związki zostały poddane charakterystyce fizykochemicznej w zakresie UV-vis i fluorescencji, oceniono ich właściwości agregacyjne i zawartość procentową PpIX w koniugacie PpIX-PEI<sub>10</sub>. Do określenia masy cząsteczkowej koniugatu Doktorantka zastosowała metodę chromatografii żelowej i na tej podstawie wywnioskowała, że średnia masa cząsteczkowa jest zbliżona do ok. 10 kDa dla koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub>. W dalszej części przedstawiła analizę NMR. Należy się w tym miejscu zgodzić z Doktorantką, że z uwagi na zawartość PpIX w koniugacie, akurat ta technika może pomóc jedynie pośrednio scharakteryzować badany związek, niemniej jednak przedstawione dane NMR, szczególnie widma <sup>13</sup>C NMR wystarczająco potwierdzają uzyskanie koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub>. Uzupełnieniem badań fizykochemicznych było wykonanie pomiarów dynamicznego rozpraszania światła oraz potencjału zeta dla cząstek PpIX-PEI<sub>10</sub>, z których jednoznacznie wynika, że uzyskany koniugat ulega agregacji. W tym miejscu zastanowiło mnie, czy Doktorantka przeprowadziła podobne studia fizykochemiczne dla koniugatu PpIX-PEI<sub>60</sub>? Czy w przypadku oceny masy koniugatu Doktorantka rozważała zastosowanie techniki MS MALDI? Czy badany koniugat był oceniany technikami IR? W kolejnym podrozdziale Pani mgr Rząd przeprowadziła studia w zakresie oddziaływań fotosensybilizatorów z modelową dwuwarstwą

lipidową. Najpierw przedstawiła materiały, aparaturę i procedury badawcze dotyczące otrzymywania liposomów z fosfatydylocholiny, w tym modyfikowanych DOPA. Następnie omówiła metodykę pomiarów stałej przyłączenia ( $K_b$ ), wygaszania fluorescencji i oceny stabilności liposomów. Bardzo unikalna i wymagająca dużej wiedzy warsztatowej jest opisana dalej metodyka w zakresie przygotowywania fosfolipidów do badań monowarstw przy użyciu wagi Langmuira, jak i samych liposomów do dalszych badań, a także prowadzenia badań mikroskopowych i badań przy użyciu wagi Langmuira, badań tekstury monowarstw z użyciem mikroskopu kąta Brewstera oraz skaningowej kalorymetrii różnicowej. Stałe przyłączenia do liposomów ekstrudowanych, jak i sonikowanych wyznaczono z wykorzystaniem metody spektrofluorymetrycznej zarówno dla PpIX, jak i dla koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub>. Średnie wartości stałej przyłączenia  $K_b$  koniugatu na poziomie  $5,73 \text{ (mg/ml)}^{-1}$  były istotnie niższe aniżeli dla PpIX i kilku fotosensybilizatorów referencyjnych, co jak zasugerowała Doktorantka może wynikać z utrudnionego wnikania porfiryny do liposomu. Doktorantka kontynuowała pogłębioną analizę tego problemu stosując liposomy modyfikowane DOPA, jednak i tym razem nie zaobserwowała poprawy wnikania porfiryn do liposomów. Eksperymenty zostały także wykonane dla koniugatu PpIX-PEI<sub>60</sub>. Z uwagi na jeszcze niższą wartość stałej przyłączenia  $K_b$  koniugatu na poziomie  $3,41 \text{ (mg/ml)}^{-1}$  Doktorantka słusznie zauważyła rolę zawady sterycznej, tworzonej przez PEI. W dalszych badaniach Pani mgr Rząd określiła mechanizm dynamicznego wygaszania fluorescencji dla koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub>, opierając się na zależności Sterna-Volmera. Warto zauważyć, że stała Sterna-Volmera dla próbki liposomalnej jest 20 razy mniejsza niż dla koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub>, co potwierdza obecność PpIX w dwuwarstwie lipidowej. Ciekawą część badań, która świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu warsztatowym Doktorantki, stanowi ocena stabilności liposomów z wykorzystaniem roztworu Tritonu X-100, przeprowadzona zarówno dla formułacji liposomalnej, formułacji liposomalnej z PEI<sub>10</sub>, jak i formułacji liposomalnej z koniugatem Pp-PEI<sub>10</sub>. Bardzo interesujące są wykonane przez Doktorantkę badania oddziaływania koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub> z błoną lipidową specjalnie w tym celu uzyskanych liposomów olbrzymich, z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Do kluczowych badań należy także ocena oddziaływań fotosensybilizatorów z lipidami błony bakteryjnej, którą Doktorantka przeprowadziła na modelowych układach monowarstw lipidowych z wykorzystaniem wagi Langmuira i skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej. Eksperymenty z użyciem polikationowego koniugatu PpIX-PEI<sub>10</sub> z monowarstwami o charakterze anionowym: DPPG i POPE/DPPG (3:1), a także z monowarstwą o charakterze zwitterjonowym POPE, trafnie pokazały elektrostatyczną naturę tych oddziaływań. Uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i z pewnością są dobrym punktem wyjścia do planowania dalszych prac. Zaplanowane przez Doktorantkę badania objęły także ocenę oddziaływań otrzymanych koniugatów z komórkami bakteryjnymi oraz biofilmem bakteryjnym. Doktorantka najpierw przedstawiła materiały, aparaturę i procedury badawcze związane z namnażaniem bakterii planktonicznych,

tworzeniem biofilmów *in vitro*, wychwytem fotosensybilizatorów przez bakterie w formie planktonu i w biofilmie. Dalej omówiła sposób prowadzenia modelowego eksperymentu aPDT i oceny cytotoksyczności badanych fotosensybilizatorów. Przy okazji oceny wychwytu wolnego fotosensybilizatora PpIX oraz koniugatów PpIX-PEI<sub>10</sub> i PpIX-PEI<sub>60</sub>, zaobserwowała ciekawe różnice pomiędzy planktonem i biofilmem w odniesieniu do koniugatów, a wynikające z wielkości polikationowego ugrupowania. Analogiczny eksperyment Pani mgr Rząd przeprowadziła dla bakterii Gram-. Badania te wraz z wykonanymi dalej modelowymi eksperymentami aPDT dla bakterii Gram+ i Gram- w formie planktonu i biofilmu doprowadziły do bardzo ciekawych konkluzji. Doktorantka stwierdziła wysoką efektywność niszczenia przez koniugat PpIX-PEI<sub>60</sub> komórek Gram+ w formie planktonu oraz biofilmu. Z kolei analogiczny eksperyment przeprowadzony dla bakterii G- wskazał na wysoką efektywność obu koniugatów. Doktorantka krytycznie przedyskutowała uzyskane wyniki, słusznie wyciągając wnioski na temat roli obu komponentów koniugatu: PEI jako składnika oddziałującego z błoną komórkową bakterii i rozluźniającego jej strukturę oraz porfiryny jako elementu generującego tlen singletowy wewnątrz błony bakteryjnej i prowadzącego do jej degradacji. Eksperyment oceniający cytotoksyczność fotosensybilizatorów przeprowadziła na mysich fibroblastach NIH3T3. Z danych eksperymentalnych wynika, że zarówno użyte związki, jak i dawki promieniowania nie działają szkodliwie na komórki. Zastanawiają mnie dwie kwestie. Czy eksperyment kontrolny przy dawce 10 J został celowo pominięty? W jaki sposób wytłumaczyć silny efekt proliferacyjny w hodowli podczas stosowania koniugatu PpIX-PEI<sub>60</sub>, który przy dawce 20 J sięga niemal 160%? Ze sposobu prezentacji badań daje się zauważyć, że badania nabierały coraz większego tempa, a Doktorantka w trakcie realizacji pracy stawiała sobie nowe cele. Szczególnie dobrze widać to w dalej opisywanych badaniach dotyczących fototoksyczności porfiryńowych fotosensybilizatorów niejonowych i anionowych, dzięki czemu udało poddać weryfikacji hipotezę dotyczącą mechanizmu fototoksycznego działania koniugatów PpIX-PEI opartą na oddziaływaniach elektrostatycznych. Doktorantka jednoznacznie wykazała, że anionowe i niejonowe fotosensybilizatory wykazują ograniczoną efektywność w procesie niszczenia bakterii w formie planktonu i nie wykazują efektu cytotoksycznego względem badanych linii komórek mysich i ludzkich fibroblastów. W ostatnim rozdziale Doktorantka podjęła się opracowania formułacji dla fotosensybilizatorów i oceny aktywności w aPDT proponując konkretne układy do kontrolowanego dostarczania i uwalniania fotosensybilizatorów w komórkach bakteryjnych. Najpierw przedstawiła materiały, aparaturę i procedury badawcze związane z otrzymaniem miceli polimerowych, polimerosomów i liposomów, a także badań biologicznych i fizykochemicznych. Fototoksyczność fotosensybilizatorów oceniła w roztworze wodnym oraz po enkapsulacji w micelach polimerowych, polimerosomach i liposomach względem *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Pani mgr Rząd zbadała także wpływ długości fali światła na efekt fototoksyczny naświetlając próbki w zakresie długofalowym

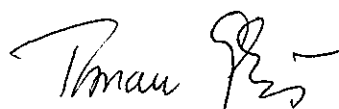
powyżej 600 nm. Dopełnieniem tej części badań było przeprowadzenie testów cytotoksyczności na dwóch liniach komórkowych mysich i ludzkich fibroblastów. Cześć eksperymentalna została podsumowana w podrozdziale **Ogólne podsumowanie i wnioski**, w którym Doktorantka jeszcze raz przedyskutowała najważniejsze wyniki badań. Dopełnieniem prac jest przedstawiony w kolejnym podrozdziale **Dorobek naukowy** Doktorantki, na który składają się 2 publikacje naukowe o łącznym IF 5,156 (punktacji MNiSW 62, cytowane 27 razy), 11 prezentacji konferencyjnych, 2 staże w renomowanych ośrodkach naukowych o łącznym czasie trwania 10 tygodni, a także udział w programie stypendialnym z POKL.

Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca w szerokiej perspektywie opracowania nowych fotosensybilizatorów na styku stosowania zaawansowanych metod chemii organicznej, fizycznej, mikrobiologii i chemii leków, wydawała się bardzo racjonalna. W miarę postępu prac badawczych została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wyników, które mają duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Doktorantka przeprowadziła bardzo ciekawą analizę pomiędzy strukturą uzyskanych związków, a ich właściwościami fizykochemicznymi oraz aktywnością w aPDT i cytotoksycznością, wykazując zróżnicowane efekty w zależności od stosowania formy wolnej fotosensybilizatora i koniugowanej z PEI, a także po wbudowaniu w nośniki. Badania Doktorantki wnoszą tym samym ważne przesłanki dla chemii leków, w szczególności związanej z projektowaniem nowych fotosensybilizatorów o potencjalnym zastosowaniu w antybakteryjnej terapii fotodynamicznej. Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Rząd jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został poprawnie zrealizowany w części eksperymentalnej, przedstawiony w wynikach i ich omówieniu, a także podsumowany we wnioskach oraz streszczeniu. Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada trzy płaszczyzny pozwalające ją analizować jako nowatorską: (i) podjęcie zagadnień bardzo aktualnych naukowo i społecznie poprzez włączenie się w nurt poszukiwania nowych i skuteczniejszych leków na choroby bakteryjne, (ii) zastosowany nowoczesny warsztat badawczy oraz (iii) duży potencjał poznawczy i aplikacyjny przeprowadzonych badań związany z opracowaniem aktywnych fotosensybilizatorów. Praca napisana jest bardzo starannie, napotkałem zaledwie na kilka błędów edytorskich, które nie umniejszają mojej wysokiej oceny dysertacji. Zwracam uwagę na drobne kwestie, które pojawiły się podczas czytania dysertacji i poproszę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony: (i) związane z edycją/tłumaczeniem z języka angielskiego/formą zapisu: s. 8, 45 - Pseudomonas; s. 15, 29, 30 – teksafiryne, purpuryna, Photofrin, zwracam też uwagę, że Foscan jest pochodną chlorynu (Rys. 1-3), cynowa etiopurpuryna zawiera w strukturze ester etylowy (Rys. 1-4), na Rys. 1-4 pokazano tylko jeden z dwóch regioizomerów występujących w preparacie Verteporfin, s. 23 – przy omawianiu celów pracy zalecam stosowanie czasu przyszłego, s. 28 – niezbyt czytelny sposób przedstawienia profili widm absorpcyjnych; s. 82 – zapis mg/ml, s. 103 – Langmuira, s. 162 – zbędne dane umieszczone przy cytowaniu 51, 63, 97; (ii) s. 10 – błąd w numeracji podrozdziałów w obrębie 6.2.; (iii) s. 61 – brak

wyjaśnienia skrótu EDC; (iv) przy widmach fluorescencyjnych np. Rys. 5-4, 6-5, 6-6 nie znalazłem długości fali wzbudzenia; (v) s. 104 – Czy użyty w badaniach szczep bakteryjny *P. aeruginosa* (P.a. 14) był szczepem szpitalnym?

**Reasumując uważam, że Pani mgr Ewa Rząd doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja bardzo wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu chemii organicznej, chemii fizycznej i chemii medycznej. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. - O stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. RP nr 65, poz. 595 z 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami, w tym Ustawą z dnia 28 kwietnia 2017 r. – O zmianie ustawy o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz.U. RP poz. 859 z 2017 r., dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii o dopuszczenie mgr Ewy Rząd do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.**



dr hab. Tomasz Gośliński, prof. UM