



Prof. dr hab. Andrzej Dworak

Zabrze, 27 sierpnia 2014

### **Recenzja**

#### **Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wytrwał „Oddziaływania nowych pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy) z błonami lipidowymi – liposomowymi i komórkowymi”**

Celem badań, jaki postawiła sobie Autorka, jest zbadanie właściwości nowych pochodnych polimerów zawierających grupy aminowe, otrzymanych przez transformacje poli(chlorowodoru alliloaminy), a w szczególności oddziaływania tych polimerów z układami lipidowymi: błonami liposomów i komórkami.

Cel należy uznać za istotny. Badania oddziaływania polimerów syntetycznych z układami biochemicznymi lub biologicznymi są ważne zarówno z czysto poznawczego jak i z aplikacyjnego punktu widzenia. Badania oddziaływań dobrze zdefiniowanych polimerów syntetycznych z układami biologicznymi pozwalają lepiej zrozumieć strukturę i funkcję tych ostatnich. Dostarczają także wiedzy, niezbędnej dla projektowania środków leczących lub ich prekursorów, są także niezbędne dla zrozumienia procesów, ogólnie nazywanych inżynierią genetyczną.

Polimery zawierające w makrocząsteczce grupy aminowe są często badane pod tym kątem. Klasycznym układem jest polietylenoimina, zarówno rozgałęziona, jak i liniowa, i jej pochodne. Badane są także inne układy aminowe, oparte o polimery winylowe, akrylowe i inne. Mimo obszernych badań problem oddziaływania takich polimerów z substancjami biologicznymi jest daleki od pełnego zrozumienia, a zasób wiedzy rzadko pozwala na proste i daleko idące uogólnienia.

Temat pracy należy więc uznać za ważny i ze wszech miar wart podjęcia.

Wysoko należy także ocenić linię badań Autorki: synteza polimerów w celu otrzymania struktur, od których oczekiwać można interesujących właściwości biologicznych – dowód struktury w niezbędnym zakresie – zachowanie w roztworach wodnych – oddziaływanie z powierzchnią, warstwy LbL - oddziaływanie z liposomami, możliwymi modelami błon komórkowych – badanie transfekcji genów. Ta linia jest logiczna i konsekwentna, świadczy o starannym przemyśleniu i zaplanowaniu eksperymentów. Jest to istotną zaletą ocenianej pracy.

Pierwsze 50 stron recenzowanej pracy poświęcone jest omówieniu literatury, związanej z przedmiotem badań Autorki. Przegląd jest zwarty i dotyczy tylko problemów, które stanowią tło dla własnych badań, opisanych w dalszych częściach pracy. Autorka omawia pokrótce właściwości (bo nie syntezę ani metody badania) polie-

lektrolitów i, ściśle z tym związanych, polipeksów: kompleksów DNA z polielektrolitami, analizuje metody otrzymywania wielowarstw polimerowych i wybrane właściwości takich układów. Nieco szerzej Autorka analizuje powstawanie, właściwości i prawidłowości rządzące właściwościami liposomów: niewielkich pęcherzyków o ścianach modelujących ściany komórek, stabilność takich układów i ich zastosowanie. Ostatnia część przeglądu stanu wiedzy dotyczy transfekcji genów, szczególnie przy użyciu polimerów.

Opis stanu wiedzy jest zwięzły. Materiał prezentowany w tym opisie jest starannie dobrany i podporządkowany prezentacji własnych wyników Autorki; przedstawionym w dalszych częściach rozprawy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje, że Autorka na końcu każdego rozdziału „części teoretycznej” krótko wskazuje związek między opisywanym stanem wiedzy a jej własnymi dokonaniem, opisanymi dalej.

Część teoretyczna dostarcza czytelnikowi wystarczającego zasobu wiedzy (lub wskazówek, gdzie taki stan znaleźć), by mógł on zrozumieć i ocenić wyniki własnych eksperymentów Autorki.

Na pozostałych ponad 130 stronach Autorka przedstawia własne wyniki i dyskutuje wypływające z nich wnioski.

Znów podkreślić należy logiczny układ tych części. Opis eksperymentów jest każdorazowo częścią rozdziału, opisującego i analizującego otrzymane wyniki. Ten nieczęsto spotykany układ (najczęściej autorzy skupiają opis wszystkich eksperymentów w jednym rozdziale) należy ocenić bardzo pozytywnie, gdyż znakomicie ułatwia on czytelnikowi lekturę i zrozumienie opisywanych wyników.

Pierwszą część analizy otrzymanych wyników Autorka poświęca opisowi syntezy polimerów, stosowanych w dalszych częściach.

Podstawowym „szkieletem” badanych polimerów jest poli(chlorowodorek alliloaminy). Ten wyjściowy polimer jest znany i opisywany, przede wszystkim z uwagi na zawarte w nim grupy aminowe, obiecujące ciekawe oddziaływanie biochemiczne. Niestety, jest on bardzo toksyczny. Autorka uzasadnia, jak tę trudność ominąć, proponuje i wykonuje syntezy nowych polimerów. Wprowadza funkcje hydroksylowe i grupy hydrofobowe, sterując w ten - sposób powinowactwem do wody, niezależnie od zmniejszenia toksyczności. Stosowane syntezy są wydajne i proste, co z oczywistych powodów jest ich zaletą. Autorka prowadzi dowód struktury w stopniu, wystarczającym dla jej potwierdzenia.

W dalszej części Autorka opisuje właściwości otrzymanych polimerów w wodzie i, co ważne i niezbyt często wykonywane, w roztworze buforu, a więc w warunkach zbliżonych do rzeczywistych warunków stosowania. Oczywiście szkoda, że Autorce nie udało się uzyskać nawet jakościowych informacji o masach molowych badanych polimerów i ich rozkładach. Chromatografia SEC polielektrolitów jest niezbyt często możliwa, gdyż czysto entropowy rozdział naładowanych polimerów jest rzadki. Pomiar lepkości natomiast są kapryśne. Inne techniki, dostępne przecież Autorce, były bardziej obiecujące, choć przyznać trzeba, że uzyskane dane prawdopodobnie nie mogłyby rzutować jakościowo na wnioski z prac Autorki.

Autorka dość starannie bada proces agregacji amfifilowych polimerów w badanych roztworach, wyznaczając rozmiary agregatów, ich potencjał powierzchniowy i krytyczne stężenie agregacji. Autorka słusznie nie wypowiada się na temat wewnętrznej struktury powstających agregatów, gdyż nie są to oczywiście układy micelarne. Opisany jest wpływ filtracji, choć szkoda, że nie ma dokładniejszego opisu, jak znaczne naprężenia ścinające, towarzyszące filtracji, wpływają na strukturę agregatów. W końcu Autorka bada cytotoxycznosc otrzymanych polimerów. Inaczej niż silnie toksyczny poli(chlorowodorek alliloaminy) amfifilowe polimery, otrzymane przez Autorkę, są znacznie lepiej tolerowane przez fibroblasty.

Uzbrojona w te wstępne dane Autorka przystępuje do dalszego badania otrzymanych polimerów.

W pierwszym rzędzie w pracy opisano tworzenie mono- i wielowarstw polimerowych. Jako polianion Autorka stosuje otrzymany przez siebie poli(allilosulfamidynian sodu). Bada właściwości warstw (kąt zwilżania, grubość

w funkcji rodzaju stosowanego polimeru i liczby warstw) i wreszcie dochodzi do opisu oddziaływania takich warstw z komórkami. Dla recenzenta szczególnie zajmujący jest opis ruchliwości fibroblastów na modelu rany, stanowiące cenny przyczynek dla zrozumienia mechanizmu leczenia trudno gojących się ran.

W kolejnym rozdziale Autorka dość starannie opisuje oddziaływania otrzymanych pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy) z wybranymi liposomami, otrzymanymi z fosfolipidów.

Liposomy, „puste” wewnątrz pęcherzyki o ścianach będących (najczęściej) warstwą podwójną amfifilowych polimerów, są bardzo interesującym przedmiotem badań zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Są one dość prostym i bardzo ciekawym modelem komórki, a przynajmniej jej ściany. Ich badanie dostarcza informacji o funkcji tego organu. Liposomy powinny być dobrym nośnikiem substancji aktywnych i pod tym względem są intensywnie badane. Ważnym aspektem badań jest ich stabilność, transport i uwalnianie enkapsulowanej w ich wnętrzu substancji aktywnej. Tym problemom poświęcone są badania doktorantki.

Autorka stabilizuje liposomy pokrywając je warstwami otrzymanych polielektrolitów i ustala optymalne warunki takiej stabilizacji (choć kryterium optymalizacji nie jest wyraźnie określone). Stabilność bada miareczkując liposomy roztworem detergentu, a właściwości transportowe ustala śledząc szybkość uwalniania kalceiny. Znowu podkreślić należy, że Autorka prowadzi badania w warunkach, zbliżonych do naturalnych. Ustala rolę „ochronnego” pokrycia ścian liposomów amfifilowymi polimerami. Do badania struktury liposomów wykorzystuje zaawansowane (i trudne) techniki mikroskopowe, przede wszystkim kriogeniczną mikroskopię elektronową. Wpływ pokrycia badanymi polielektrolitami Autorka analizuje przywołując role oddziaływań jonowych, typowych dla polielektrolitów, i oddziaływań tzw. „hydrofobowych”, za które odpowiedzialne są alkilowe podstawniki.

Cennym uzupełnieniem jest symulacja struktury warstw liposomów, otrzymana metodami obliczeniowymi. Wyniki takich symulacji dostarczają danych, co najmniej niesprzecznych z wynikami eksperymentów.

Ostania część badań autorki dotyczy zastosowania otrzymanych polielektrolitów, a raczej polipleksów utworzonych z plazmidowego DNA i tych polimerów, do transfekcji genów. Transfekcja genów jest intensywnie badana: stanowi ona istotne i obiecujące narzędzie terapeutyczne, a także wywołujące emocje narzędzie inżynierii genetycznej. Niewirusowe nośniki do transfekcji są ważne, gdyż nie prowadzą do związanych ze stosowaniem wirusów niepożądanych efektów ubocznych. Takie nośniki to najczęściej polimery, zawierające w makrocząsteczce (niekoniecznie liniowej) grupy aminowe. Dążenie do uzyskania maksymalnej wydajności transfekcji przy zachowaniu minimalnej cytotoksyczności jest zasadniczą linią takich badań.

Oczywiste jest, że – także w świetle wcześniej opisanych własnych badań – Autorka postanowiła wykonać badania transfekcji plazmidowego DNA przy użyciu „własnych” aminowych polielektrolitów. Syntezę polimerów, zawierających w łańcuchu pierwszo- drugo- i trzeciorzędowe grupy aminowe obok grup OH i grup amoniowych Autorka wykonała w oparciu o opracowane przez siebie metody. Efektywność transfekcji Autorka porównała z efektywnością transfekcji uzyskiwaną za pomocą komercyjnie dostępnej, dość powszechnie stosowanej liniowej polietylenoiminy.

Doktorantka otrzymała i scharakteryzowała polipleksy. Udowodniła, że cytotoksyczność badanych polimerów jest niższa lub bardzo bliska niewielkiej cytotoksyczności polietylenoiminy. Z badań Autorki wynika, że efektywność transfekcji do komórek nowotworowych HeLa przy użyciu otrzymanych przez Autorkę polimerów jest wyższa, niż mierzona przy zastosowaniu liniowej polietylenoiminy.

Obowiązkiem recenzenta jest zwrócić uwagę na błędy i słabe strony pracy, jeśli takie znalazł.

Trudno je było znaleźć, a znalezione dotyczą przede wszystkim redakcji i języka. Skróty myślowe Autorki czasem idą zbyt daleko, jak np. w sformułowaniu na stronie 37 „Jako, że polielektrolity są rozpuszczalne w wodzie, używane są także w układach do aplikacji biomedycznych t.j. superhydrofobowe pokrycia...”- polielek-

trolity nie są superhydrofobowe, czy na str. 40 „Oddziaływania polarne... ..przyczyniają się do zdefiniowania struktury przestrzennej...” – definiowanie to jednak dzieło ludzkiego umysłu, nie oddziaływań. Dyskusja cmc na str. 41 jest chyba zbędna (nigdzie w pracy badane polimery nie tworzą miceli, a agregaty). Podobnych przejęzyczeń można znaleźć więcej. Rozumiem, że wynikają one z chęci przekazania w zwartej formie podstaw wiedzy (praktycznie braków takich nie ma w opisie własnych badań).

Opis „włókien” na rys. 5 i hydrożeli na str. 41 i rys. 7 jest zbędny: nigdzie w pracy Autorka z takimi układami nie ma do czynienia.

Purystę irytują „skaczące” krzywe np. na rys. 49 lub 50. Te krzywe mają jedynie ułatwić oglądanie i nie muszą przechodzić przez wszystkie punkty.

Walka Autorki z zasadami interpunkcji nie zawsze kończy się zwycięstwem.

Te uwagi dotyczą w zasadzie formy, a nie treści. Zostały przytoczone z obowiązku recenzenckiego i w żadnej mierze nie rzutują na wartość pracy.

Podsumowując należy stwierdzić, że w wyniku wykonanych badań Autorka uzyskała szereg istotnych, dobrze udokumentowanych wyników, dotyczących zachowania nowych pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy). Linia badań jest jasno określona, a ich zakres starannie ustalony: od prostych, eleganckich syntez niosących ładunek amfifilowych polimerów, poprzez ich zachowanie w roztworze, oddziaływanie z powierzchnią ciała stałego (warstwy  $\text{LbL}$ ) i z liposomami po ich zastosowanie do transfekcji genów do komórek nowotworowych. W mojej opinii, praca spełnia z nadmiarem wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65). Wnioskuje o dopuszczenie mgr Magdaleny Wytrwał do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie pragnę zwrócić uwagę na fakt, że badania mgr Wytrwał są przedmiotem pięciu publikacji, w tym czterech w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Ostatnio dowiedziałem się, że wyniki badań są także przedmiotem zgłoszenia patentowego. 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 Magdaleny Wytrwał.



prof. dr hab. Andrzej Dworak