



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. Magdaleny Wytrwał

wykonanej w Zespole Nanotechnologii Polimerów i Biomateriałów w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Oddziaływania nowych pochodnych poli(chlorowodorku alliloaminy) z błonami lipidowymi – liposomowymi i komórkowymi

Recenzowana praca została wykonana pod opieką prof. dr. hab. Marii Nowakowskiej, w której zespole od lat z dużym powodzeniem prowadzone są badania dotyczące fotochemii związków wielkocząsteczkowych, właściwości cząsteczek i makrocząsteczek na granicy faz oraz badania oddziaływań i funkcji makrocząsteczek naturalnych i syntetycznych w układach biologicznych. Tematyka pracy odnosi się do dwóch ostatnich z wymierzonych powyżej grup zagadnień. Mgr Magdalena Wytrwał postanowiła zbadać oddziaływania polimerów ważnych ze względu na możliwości ich zastosowań w medycynie, z powłokami liposomów i z błonami komórkowymi. Badania dotyczyły poli(chlorku alliloaminy) i obszernej grupy jego pochodnych. Poznanie ich struktury i właściwości fizykochemicznych a także właściwości formowanych z nich wielowarstw, oraz poznanie relacji struktury wspomnianych poliamin a także ich bioaktywności doprowadziło nie tylko do istotnego poszerzenia wiedzy o charakterze podstawowym, lecz również stworzyło podstawy do opracowania sposobów wytwarzania materiałów przydatnych do zastosowań w medycynie, w szczególności w terapii genowej, a także powłok o interesujących właściwościach biobójczych. Przeprowadzenie tych badań i uzyskanie odpowiedzi na postawione w pracy pytania wymagały od doktorantki dużej wiedzy w zakresie modyfikacji chemicznej polimerów, właściwości fizykochemicznych polijonów, badań struktury i fizykochemii koloidów oraz bioaktywności makrocząsteczek jak również umiejętności przeprowadzania doświadczeń i interpretacji ich wyników.

Mgr Magdalena Wytrwał przygotowała i przedstawiła rozprawę doktorską w tradycyjnej formie zwartego opracowania. Składają się na nią wprowadzenie zawierające również określenie celów pracy, rozdział o nazwie część teoretyczna, w którym omówiła stan wiedzy z obszaru zagadnień jakim poświęciła badania własne, pięć rozdziałów poświęconych jej pracom własnym. Ponadto, praca zawiera ważne informacje pomocnicze: krótkie streszczenia w językach polskim i angielskim, wykaz używanych skrótów, spisy tabel i rysunków, zestawy widm związków opisanych w pracy, spis cytowanej literatury liczący 283 pozycje oraz omówienie dorobku naukowego doktorantki

W recenzji 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 doktoranta w dziedzinie w jakiej prowadził prace badawcze

Mgr Magdalena Wytrwał zawarła w rozprawie wprowadzenie obejmujące: omówienie budowy i właściwości polielektrolitów, sposobów wytwarzania i właściwości wielowarstw polimerowych oraz oddziaływań komórek z podłożem polimerowym (w tym z wielowarstwami polimerowymi), omówienie sposobów wytwarzania, właściwości i zastosowań liposomów oraz sposobów formowania nośników kwasów nukleinowych i mechanizmów ich skutecznego wprowadzania do komórek.

Każdy z podrozdziałów składających się na tę część rozprawy zawierał na końcu krótkie omówienie zagadnień jakie wymagają rozwiązania i omówienie odnoszących się do nich badań własnych doktorantki.

W mojej ocenie dobór zagadnień omawianych we wprowadzeniu był w pełni prawidłowy. Wszystkie odnosiły się ściśle do badań własnych prowadzonych w ramach pracy doktorskiej. Zawierały jasne, a jednocześnie wystarczająco wyczerpujące i ściśle omówienie prezentowanych zagadnień. Jako podstawę tego opracowania mgr Magdalena Wytrwał

wykorzystała głównie prace opublikowane w ostatnich dziesięciu latach. Prace wcześniejsze zostały wybrane selektywnie. Mgr Magdalena Wytrwał odnosiła się przede wszystkim do tych, które stanowiły ważne punkty w rozwoju nauki o polikationach i innych polimerach oraz o oddziaływaniach żywych komórek różnych organizmów z materiałami polimerowymi, prac których znajomość była niezbędna do zrozumienia wyników uzyskanych w późniejszym czasie.

Materiał zawarty w części teoretycznej został przedstawiony konsekwentnie, w sposób bardzo dobrze uporządkowany i logiczny. Autorka rozpoczyna tę część rozdziału omówieniem wybranych grup polielektrolitów, następnie przechodzi do omówienia materiałów z nich zbudowanych a kończy tę część zaprezentowaniem zastosowań w odniesieniu do układów biologicznych. Na podkreślenie zasługuje to, że część teoretyczna nie jest prostym omówieniem kolejnych publikacji. Jest natomiast prezentacją zagadnień ilustrowanych przykładami wybranymi z literatury. Oczywiście, przy ogromnej liczbie prac publikowanych każdego roku inny autor mógłby dokonać wyboru innych przykładów, lecz do dokonanego przez autorkę nie mam zastrzeżeń.

Po zapoznaniu się z wprowadzeniem nie mam najmniejszych wątpliwości, że mgr Magdalena Wytrwał dysponuje pogłębioną wiedzą na temat budowy i modyfikacji polimerów jonowych i jonogennych, warstw polimerowych, formowania, właściwości i zastosowań liposomów oraz zastosowań polikationów do transportu genów do jąder komórkowych.

Na zakończenie tego fragmentu recenzji pragnę podkreślić, że prezentacja obecnego stanu wiedzy o zastosowaniach materiałów polikationowych do szeroko pojmowanych celów medycznych, dokonana przez doktorantkę, stanowi przekonujące uzasadnienie celowości podjęcia badań stanowiących podstawę jej pracy doktorskiej.

Rozwój wiedzy będący wynikiem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej

Moim zdaniem najważniejszym osiągnięciem będącym wynikiem badań przeprowadzonych przez mgr Mgdalenę Wytrwał jest opracowanie sposobów wytwarzania efektywnych i niecytotoksycznych nośników materiału genetycznego. Uzyskane wyniki badań stanowią solidną podstawę do zaplanowania badań *in-vivo*. Brak dobrych, nietoksycznych nośników umożliwiających efektywną transfekcję genów stanowi zasadnicze ograniczenie rozwoju terapii genowej. Każdy postęp w tej dziedzinie ma ogromne znaczenie. Podczas realizacji badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Wytrwał zostały

uzyskane również inne bardzo wartościowe wyniki. Opracowanie prostych metod syntezy pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy) umożliwiło doktorantce otrzymanie palety poliamin i ich pochodnych zawierających czwartorzędowe kationy amoniowe różniące się pod względem lokalizacji grup jonowych w stosunku do głównego łańcucha polimerowego i gęstości ich rozmieszczenia w łańcuchach. Dzięki temu doktorantka mogła przeprowadzić badania wpływu konkretnych zmian struktury polimerów na ich zdolności do agregacji w uporządkowane struktury oraz zbadać ich oddziaływanie z błonami liposomów. Doprowadziły one do zrozumienia fizykochemicznych podstaw stabilizacji lub destabilizacji liposomów w wyniku pokrywania ich powierzchni polikationami. Wartościowym uzupełnieniem tych prac było zastosowanie metod dynamiki molekularnej umożliwiających obrazowanie przemian zachodzących w warstwach lipidowych pod działaniem polikationów, odpowiedzialnych za postawanie nanoporów. Dzięki tym badaniom, przez analogię, jest łatwiej zrozumieć możliwe mechanizmy destabilizacji błony komórkowej pod działaniem polikationów odpowiedzialnych za aktywność antybakteryjną tej grupy związków.

Otrzymanie wielowarstw z kationowych pochodnych poli(chlorowodoru alliloaminy) oraz z jego pochodnej polianionowej (poli(*N*-allilosulfamidynianu sodu)) stworzyło możliwości poznania wpływu struktury powierzchniowej wielowarstw na możliwości migracji komórek na ich powierzchni (migracja komórek pełni ważną rolę podczas gojenia się ran).

Przeprowadzone badania stworzyły możliwości otrzymywania nośników genów lepszych niż uznane jako punkt odniesienia nośniki z polietylenoiminy, i to nie tylko pod względem efektywności transfekcji lecz również znacznie mniejszej cytotoksyczności.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że realizacja badań, jakie złożyły się na ocenianą pracę doktorską doprowadziła do znaczącego powiększenia wiedzy o wpływie budowy polielektrolitów, będących pochodnymi poli(chlorowodoru alliloaminy), na mechanizm ich oddziaływań z układami biologicznymi, w szczególności na możliwości wykorzystania nośników polimerowych w terapii genowej.

Metody badawcze i opisy przeprowadzanych doświadczeń

Podczas realizacji badań mgr Magdalena Wytrwał wykorzystwała wiele technik badawczych związanych z reakcjami na polimerach, wytwarzaniem wielowarstw, modyfikacją liposomów przez ich pokrycie warstwą lub warstwami polimerowymi, wytwarzaniem liposomów,

polikationowych nośników genów, oraz związanych z wybranymi badaniami bioaktywności polimerów.

Obejmowały one spektroskopie ^1H i ^{13}C NMR, IR, UV-VIS, i spektroskopię fluorescencyjną, mikroskopie AFM, SEM, krio-TEM, chromatografię GPC, wiskozymetrię, dynamiczne rozproszenie światła, elipsometrię, pomiary kąta zwilżania oraz testy do podstawowych badań biologicznych. Pomocniczą, lecz bardzo istotną rolę odgrywało modelowanie komputerowe z wykorzystaniem dynamiki molekularnej.

Rozprawa zawiera wystarczająco szczegółowe informacje o stosowanych odczynnikach i materiałach. Informacje o przeprowadzeniu doświadczeń zostały opisane w sposób na tyle wyczerpujący aby czytelnik wiedział jak może je sam przeprowadzić.

Analizę wyników uzyskiwanych podczas badań przeprowadzano zgodnie z obecnym stanem wiedzy. Jedynym uchybieniem w tej mierze jest w wielu wypadkach podawanie wyników pomiarów i wartości odchylenia standardowego ze zbyt dużą liczbą miejsc znaczących. Wyznaczane wartości odchylenia standardowego we wszystkich badaniach jest związane z błędem pomiaru. Podawanie wartości błędu pomiaru z dokładnością do dwóch a nawet trzech miejsc znaczących mija się z celem. Bowiem, gdy podana wartość odchylenia standardowego pomiaru wynosi 11,3 (przykład z tabeli 24) to nie można przyjąć, że została ona wyznaczona z dokładnością do trzech miejsc znaczących.

Mimo wspomnianego niedostatku uważam, że wyniki uzyskane przez doktorantkę mogą być wykorzystywane z pełnym zaufaniem w innych pracowniach. We wszystkich wypadkach mgr Magdalena Wytwał wyraźnie określała, które pomiary prowadziły do wyników w pełni ustalonych, a które ze względu na niedostatki metody mogą być obdarzone systematycznym błędem.

W odniesieniu do opisów doświadczeń mam pewne pytania. Interesuje mnie czy rejestracje widm fluorescencji prowadzono w obecności tlenu znanego jako wygaszacz emisji, a jeśli tak, to czy nie przeszkadzała ona w badaniach. Chciałbym dowiedzieć się czy powtarzane pomiary kąta zwilżania (str 128) przeprowadzono w tym samym miejscu podłoża czy też w różnych? Czy przeprowadzono pomiary katów „advancing” i „receding”?

Mimo wymienionych powyżej drobnych niejasności uważam, że sposób przeprowadzenia doświadczeń i opracowania ich wyników zasługują na uznanie.

Jakość interpretacji uzyskanych wyników

Interpretacja wyników jakie podczas badań uzyskała doktorantka nie budzi zastrzeżeń. Dokonana została w sposób krytyczny. We wszystkich wypadkach czytelnik otrzymuje wskazówki co do zakresu możliwych ograniczeń zastosowanych metod. Czytając fragmenty dotyczące wpływu budowy powłoki polimerowej na stabilizację bądź destabilizację liposomów miałem początkowo pewne wątpliwości, jednak argumentacja przedstawiona przez mgr Magdalenę Wytrwał w pełni mnie przekonała.

Umiejętności przygotowania opracowania naukowego w formie pisemnej

Rozprawa została przedstawiona w sposób jasny. Wszystkie fragmenty łączą się konsekwentnie w logicznie uporządkowaną całość. Wykresy i rysunki zostały przygotowane w sposób przemyślany. Użycie barwnych linii na wykresach ułatwia zaznajomienie się z informacją w nich zawartą. Przygotowanie spisu rysunków i tabeli ułatwia ich odszukanie w tekście rozprawy. Pomocny jest wykaz skrótów z podaniem ich znaczenia. Ciekawym pomysłem było przygotowanie wydzielonego pakietu najważniejszych widm badanych związków. Dzięki temu czytelnik nie musi ich szukać w całym tekście. Mniej podobało mi się zakończenie poszczególnych podrozdziałów części teoretycznej krótką informacją o przeprowadzonych badaniach własnych. Uważam, że taka „zapowiedź” nie była potrzebna, bowiem i tak wyczerpujący opis musiał być przedstawiony w dalszej części rozprawy.

Muszę stwierdzić, że wołałbym aby rozprawa zawierała mniejszą liczbę błędów i niezręczności językowych. Ich pełna lista byłaby dość długa. W celu ilustracji powyższego stwierdzenia podaję tylko kilka wybranych przykładów: strona 55 „...adhezja warstwy PEI... powoduje efekt toksyczny.. (warstwa PEI jest toksyczna a nie efekt); strona 65 „...z błonami lipidowymi różniącymi się polarnymi głowami...” (czy w błonie lipidowej wyróżniamy głowy?); strona 67 „... „Innym podejściem jest stabilizacja steryczna – tworzenie tzw. liposomów niewidocznych (stealth...” (stabilizacja steryczna niekoniecznie powoduje tworzenie liposomów „stealth”); strona 143 „... dodano 1 mM Na Cl o pH 7,4 ...” (gdzieś zginęło, że jest to roztwór); strona 149 „wartość polidispersji” (powinno być dyspersyjności (IUPAC)); str 182 „... elektrostatycznych pomiędzy kationowymi grupami aminowymi” (chyba kationami amoniowymi)

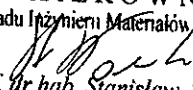
Na zakończenie pragnę podkreślić, że mgr Magdalena Wytrwał jest współautorką pięciu opublikowanych prac, jednego patentu (informacja udzielona przez doktorantkę) oraz ponad dwudziestu prezentacji konferencyjnych. Była kierownikiem grantu Preludium. Uzyskała

stypendium Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia oraz dotację projakościową z tej instytucji.

Biorąc pod uwagę wszystkie elementy oceny stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Wytrwał nie tylko spełnia wszystkie niezbędne warunki określone przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2013 z późniejszymi uzupełnieniami lecz również jest rozprawą wyróżniającą się.

W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem pozwalam sobie Wysokiej Radzie Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego przedstawić wniosek o dopuszczenie mgr. Małgdałeny Wytrwał do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje również o wyróżnienie tej pracy.

Łódź, 4 września 2014

KIEROWNIK
Zakładu Inżynierii Materiałów Polimerowych

prof. dr hab. Stanisław Słonkowski