

dr hab. Aneta Szymańska, prof. UG

Gdańsk, 28 października 2024

Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Żanety Polańskiej pt. *Układy samoorganizujące na bazie surfaktantów polimerycznych i formulacji lipidowych, charakterystyka oraz zastosowanie do tworzenia stabilnych kompleksów z kwasami nukleinowymi.*

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska wykonana została pod opieką naukową prof. dr. hab. Macieja Kozaka jako promotora oraz dr Zuzanny Pietralik-Molińskiej jako promotora pomocniczego w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca ta stanowi kontynuację, ale również rozszerzenie prowadzonych w grupie badawczej Promotora badań nad charakterystyką oraz zastosowaniami praktycznymi surfaktantów o różnym stopniu polimeryczności, w tym przypadku surfaktantów trimerycznych wzbogaconych o lipidy. Szerszym kontekstem tych badań jest ich potencjalna użyteczność jako nośników materiału genetycznego w postaci cząsteczek DNA, alternatywnych do wektorów opartych o cząstki wirusowe. Temat podjęty przez mgr Polańską jest zatem aktualny i potrzebny ponieważ przyczynić się może do dalszego rozwoju terapii genowej, w której upatruje się nadziei na opanowanie lub wyleczenie nie tylko poważnych chorób o podłożu genetycznym, ale również nowotworowych czy zwyrodnieniowych. Terapia genowa rozwijana jest od ponad 30 lat, podczas których opracowano szereg leków, które dostarczają funkcjonalne geny w postaci DNA lub RNA do docelowych komórek. Kliniczne wdrożenie terapii genowej jest jednak w dalszym ciągu ograniczone przez brak bezpiecznych i skutecznych nośników genów. Pierwotnie zastosowane wektory wirusowe nadal stanowią ich większość, coraz więcej uwagi poświęca się jednak ich niewirusowym odpowiednikom. Wektory wirusowe wykazują co prawda doskonałe zdolności transfekcji genów, jednak ich bezpieczeństwo kliniczne jest kwestionowane ze względu na ich skłonność do stymulowania reakcji immunogennych i możliwość wystąpienia mutacji związanych z insercją transgenów. Poza tym wektory wirusowe mają niską pojemność, są niezdolne do dostarczania genów o dużych rozmiarach, a ich preparacja jest skomplikowana i bardzo kosztowna. W przeciwieństwie do nich, wektory niewirusowe, w szczególności oparte o nanocząstki lipidowe i polimery kationowe, wykazują wysokie bezpieczeństwo immunologiczne, dużą pojemność genową oraz prostotę przygotowania. Dlatego zasadne jest ich rozwijanie i opracowywanie nowych formacji o ulepszonych parametrach, zwłaszcza dotyczących ich zdolności transfekcyjnych i stabilności *in vivo*. W tę tematykę badań wpisuje się praca mgr Polańskiej.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma charakter monografii. Napisana jest w języku polskim i ma klasyczny układ, tzn. składa się z dwóch głównych części – wstępu teoretycznego oraz części eksperymentalnej. Oprócz tego zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury (347 pozycji!). Całość zawarta jest na 233 stronach druku, nie jest to zatem praca „mała”, zarówno objętościowo, jak i treściowo.

Cel pracy, umieszczony na jej początku, zaraz za bardzo dobrze napisanymi streszczeniami jest, w mojej opinii nieco mylący i nie do końca precyzyjny. Zgodnie z podanym opisem jednym z zadań jakie postawiła sobie doktorantka miało być bowiem „*opracowanie metod otrzymywania układów do transfekcji kwasów nukleinowych*”. Czy Doktorantka chce transfekować kwasy nukleinowe? Czy ma myśli transfekcję kwasami nukleinowymi? Poza tym w pracy nie zaproponowano metod (w liczbie mnogiej) otrzymywania układów do transfekcji. Przedmiot badań stanowiły surfaktanty i lipopleksy na ich bazie, otrzymane za pośrednictwem jednej metody (przez zmieszanie). Otrzymane układy poddano następnie niezwykle dokładnej charakterystyce. W tym aspekcie deklarowany cel pracy całkowicie odpowiada przeprowadzonym badaniom.

Kolejno następujący wstęp do pracy podzielony został na kilka podrozdziałów prezentujących podstawowe informacje na temat terapii genowej, następnie wybranych składników proponowanego wektora czyli surfaktantów oligomerycznych i lipidów, tak oddzielnie, jak i w połączeniu, oraz metod badawczych stosowanych do charakterystyki lipopleksów (spośród których wybrano te używane w badaniach przez Doktorantkę). Nie mam uwag co do doboru prezentowanych treści – zadaniem Doktorantki w tej części pracy było przedstawienie tła i uzasadnienie wyboru obiektu badawczego. Wywiązała się z niego w sposób zadowalający, wyposażając recenzenta w wiedzę niezbędną do dalszej analizy dysertacji i weryfikacji realizacji postawionego celu. Tym co mogę tu Doktorantce ewentualnie zarzucić jest to, że wstęp jest, moim zdaniem, nieco nierówny, tak edycyjnie, jak i treściowo. Część pierwsza dotycząca terapii genowej sprawia wrażenie jakby sama Autorka nieco się z nią męczyła – zdania sprawiają wrażenie wielokrotnie edytowanych, przez co wkradają się błędy gramatyczne (głównie fleksyjne) i interpunkcyjne. Po niej następuje część, którą czyta się zdecydowanie lepiej. Doktorantka przedstawia w niej surfaktanty oligomeryczne oraz lipopleksy na bazie tychże. Informacje podane są w sposób zwięzły, wyczerpujący i zrozumiały. Szkoda tylko, że Doktorantka tak oszczędnie ilustruje swoją pracę – jeden czy dwa dodatkowe rysunki (np. przedstawienie na str. 39 struktur agregatów surfaktantów) nie powiększyłyby znacząco objętości dysertacji, a wzbogaciły by i uporządkowały jej treść. Tę można nieco zredukować rezygnując z podrozdziałów 2.2.3 i 2.3 na temat adsorpcji surfaktantów na granicy faz czy ich potencjalnych zastosowań, które nie wnoszą treści istotnych z punktu widzenia tematyki recenzowanej pracy. Podrozdział 3.1 natomiast tematycznie wiąże się bardziej z rozdziałem 2 niż 3, i tam powinien być umieszczony. Bardzo dobrze opisane są natomiast metody badawcze stosowane w pracy. Tu i ówdzie można by wprowadzić pominąć pewne informacje czysto podręcznikowe, niemniej jednak lektura tej części pracy pozwala przypuszczać, że Doktorantka rozumie swój warsztat pracy i stosuje go w sposób świadomy. Takie podejście zdecydowanie ułatwia nie tylko prowadzenie badań, ale przede wszystkim ewaluację i dyskusję otrzymanych wyników. Bardzo dobrym rozwiązaniem było też podzielenie poszczególnych metod według kryterium ich zastosowania do poszczególnych celów. Dzięki temu możliwe było podanie konkretnych, najbardziej użytecznych w kontekście prowadzonych badań informacji, bez niepotrzebnego wchodzenia w dywagacje ogólne.

Część eksperymentalna pracy rozpoczyna się od rozdziału 5, w którym Autorka przedstawia badane związki i krótko omawia preparatykę próbek, oraz aparaturę pomiarową i metody eksperymentalne. Dla ścisłości - podrozdział 5.3. powinien być, moim zdaniem, tak właśnie zatytułowany, ponieważ obecny tytuł „Aparatura pomiarowa” nie do końca oddaje jego treść. Oprócz specyfikacji urządzeń zawiera on bowiem istotne informacje o sposobie przygotowania próbek do badań i opis prowadzonych pomiarów. Bardzo skąpa jest za to informacja dotycząca kwasów nukleinowych wybranych do badań. W tym miejscu proszę o wyjaśnienie dlaczego akurat takie cząsteczki wybrano, jakie były ich sekwencje oraz, w szczególności – dlaczego jako modelu wielocząsteczkowego zdecydowano się użyć preparatu o nie do końca zdefiniowanym składzie i charakterystyce (opisywanego jako DNA o wielkości 20 kpz). Preparat ten okazał się być mieszaniną

wielce pofragmentowaną, która przysporzyła w praktyce więcej problemów niż korzyści. Czy Doktorantka nie rozważała użycia np. jakiegoś komercyjnie dostępnego plazmidu, który byłby preparatem jednorodnym, o konkretnej i powtarzalnej charakterystyce? Być może wyniki badań przeprowadzonych z jego użyciem byłyby bardziej jednoznaczne i łatwiejsze do interpretacji.

Wyniki przeprowadzonych badań opisane są w kolejnym rozdziale, który stanowi niemal połowę całej rozprawy. Jestem pod wrażeniem pracowitości Doktorantki, która doprowadziła do wygenerowania takiej ilości danych. Mgr Polańska przeprowadziła bowiem bardzo skrupulatną charakterystykę badanych układów, wyznaczając ich parametry charakterystyczne nie jedną, a kilkoma metodami, starając się uzyskać jak najbardziej dokładny i kompleksowy opis. Jest to bardzo istotne z punktu widzenia ich późniejszych zastosowań praktycznych jako nośników materiału genetycznego i leków do terapii genowej. Podejście do postawionego zadania najlepiej podsumowuje zdanie samej Autorki ze strony 133: „*Niektórzy badacze ograniczają się w swojej analizie do bardzo wąskiego obszaru np. 1460 - 1480 cm⁻¹, przez co wyselekcjonowane zostają istotne pod względem analizy pasma, jednak takie uproszczenie nie pokazuje w pełni złożoności i wzajemnego wpływu pasm składowych w tym obszarze, co może tylko zwiększać błąd odczytu.*” Odnosi się ono co prawda do charakterystyki przemian fazowych badanych formacji lipidowych, można je jednak śmiało zastosować je do całej pracy. Jako że jednak każdy kij ma dwa końce, prowadzi to do wspomnianej wyżej mnogości danych. Na szczęście Doktorantka zdaje się nam nimi doskonale panować i prowadzi czytelnika przez kolejne etapy swojej pracy w sposób niemalże bezkolizyjny. Jedyne, co mi osobiście utrudniało nieco podążanie za Jej tokiem myślenia był brak jasnego klucza, według którego mgr Polańska omawia prezentowane wyniki. Przy wielu opisach, zwłaszcza układów wieloskładnikowych, jak kompleksy kwasów nukleinowych z DNA lub z fosfolipidami, Autorka wybiera jeden przykład, który omawia stosując frazę „zostanie omówione na przykładzie”. Niestety nie wyjaśnia, dlaczego akurat taki przykład wybrała. Proszę zatem o uzasadnienie kilku wyborów np. dlaczego do zbadania markerów form DNA (str. 118) lub wyznaczania parametrów przejść układach surfaktant/fosfolipid (str. 137) wybrano surfaktant TRI_BEN, który w innych eksperymentach wydawał się być bardziej problematyczny od pozostałych? Dla jasności, Doktorantka omawia również pozostałe układy, skoro jednak stosuje taką formułę, chętnie dowiem się z jakiego powodu.

Część eksperymentalną zamyka rozdział przedstawiający próby zobrazowania badanych układów za pomocą mikroskopii sił atomowych. Badania te okazały się być najtrudniejsze do przeprowadzenia i interpretacji i, moim zdaniem, nie są one w tej pracy niezbędne. Jedynym sukcesem, jaki tu znalazłam jest wykazanie przez Doktorantkę, że (str. 178) „*Otrzymane wyniki badań AFM dla wysokomolekularnego DNA jednoznacznie potwierdziły, możliwa jest obserwacja pojedynczych nici DNA: nie w postaci kulistych agregatów, a w formie zbliżonej do „zrelaksowanej” (rozciągniętej) w roztworze*”. Nie jest to, niestety, nic odkrywczego, bowiem obserwacje takie dokonywane są już od wielu lat. Pominięcie tego rozdziału nie przyniosłoby żadnej szkody przedstawionej pracy.

Obraz jaki wyłania się z przedstawionych wyników nie jest może do końca satysfakcjonujący (głównie dla samej Doktorantki), nie udało się bowiem wyjaśnić pewnych zagadnień czy zaproponować konkretnej formułacji nośnika dla DNA do terapii genowej, jednak ilość uzyskanych nowych i cennych informacji jest nie do przecenienia. Sama Autorka, w krytycznym i dojrzałym podsumowaniu dysertacji wypunktowuje swoje sukcesy i porażki. Co więcej, zarysowuje przyszłościowe plany badawcze, dla których uzyskane przez Nią wyniki będą kluczowe.

Przechodząc do oceny strony „technicznej” pracy, zmuszona jestem stwierdzić, że, niestety, nie jest ona doskonała, szczególnie pod względem edycyjnym. Język naukowy jest jak najbardziej poprawny, jednak stronę interpunkcyjną w znacznym stopniu zaliczyć można raczej do kategorii

„kreatywnej”. Inną cechą rozprawy są „modernistyczne” konstrukcje zdaniowe – zlepki kilku fraz, które powinny stanowić oddzielne zdania. Kilka przykładów z pierwszych stron pracy:

- str. 18: „Rozdział siódmy to podsumowanie i dyskusja otrzymanych wyników, choć wiele kwestii było już wstępnie omawianych w trakcie analizy wyników, co w dużej mierze wynikało to z wyjaśnienia sposobu analizy danych.”

- str. 27: „Są to nośniki na bazie polimerów, charakteryzują się niższą wrażliwością na degradację przez enzymy zewnątrzkomórkowe w porównaniu do nośników na bazie lipidów, są także stabilniejsze i można łatwiej manipulować ich właściwościami fizycznymi”.

- str. 28: „Jednak duża gęstość ładunku dodatniego PLL ogranicza ucieczkę endosomalną i zwiększa cytotoksyczność, aby to zniwelować do polipleksu na bazie PLL dołącza się chlorochinę lub inny polimer np. PEG” lub (na tej samej stronie) „CPPs może się wiązać elektrostatycznie z DNA, ale choć jest to wiązanie silne to niestety niestabilne, dlatego chcąc wykorzystać CPPs jako nośniki, odpowiednio przygotowuje się koniugaty CPPs-DNA, które połączone są ze sobą kowalencyjnie za pomocą dodatkowego środka sieciującego (ang. cross-linker)”

- str. 33: „Ucieczka endosomalna możliwa jest np. na skutek obniżonego pH, niektóre substancje zmieniają swoją konformację, co umożliwia przenikanie przez pory w błonie endosomu, innym sposobem jest wywoływanie efektu gąbki protonowej lub tworzenia odwrotnej fazy heksagonalnej przez niektóre lipidy”

Oraz zdanie ze str. 109, przy którym Autorka chyba całkowicie straciła czujność: „Kompleksy TRI_N/L1/DNA_20kbp oraz TRI_N/L3/DNA_20kbp osiągają zerowy potencjał ζ wynoszą przy $p/n > 1$, dla oraz, natomiast TRI_N/L2/DNA_20kbp przy $p/n > 0,5$.”

Przedstawiam te przykłady nie w celu podważenia zdolności do redagowania tekstu naukowego przed Doktorantką, ale by podkreślić jak ważne dla komunikacji z potencjalnym odbiorcą jest poprawne formułowanie myśli i ścisłe przestrzeganie zasad gramatyki języka polskiego. W innym razie łatwo dojść może do nieporozumień czy niepoprawnej interpretacji. Na szczęście zdań tego typu jest niewiele w najważniejszej części pracy, czyli prezentacji i omówieniu wyników.

Podczas lektury dysertacji wynotowałam dodatkowo kilka pytań, o odpowiedź na które proszę Doktorantkę podczas obrony:

- Dlaczego badano skład chemiczny surfaktantów? Czy nie zostały one scharakteryzowane przez ich twórcę, dr hab. Andrzeja Skrzypczaka? Jeśli nie, to, czy zdaniem Doktorantki, zastosowana metoda jest wystarczająca do jednoznacznego potwierdzenia ich tożsamości chemicznej?

- Dlaczego do wyznaczenia liczby agregacji zastosowano tylko trzy (a właściwie dwa) stężenia czynnika wygaszającego? Poprowadzenie korelacji dla trzech punktów pomiarowych jest, delikatnie mówiąc, mało znaczące i wiarygodne.

- Jak Autorka interpretuje obserwację, że „dłuższe fragmenty DNA kompleksują przy niższych stężeniach surfaktanta” (str. 105) ?

- Jaki jest związek między entalpią procesu wyznaczoną eksperymentalnie, entalpią van't Hoffa i oceną kooperatywności przemiany?

Chcę podkreślić, że powyższe uwagi nie wpływają negatywnie na całościowy odbiór pracy. Jest to dysertacja ważna, dostarczająca wielu nowych informacji na temat oligomerycznych surfaktantów oraz ich połączeń z fosfolipidami, które stanowią mogą bazę nowych czynników stabilizujących DNA i ułatwiających jego wprowadzanie do komórek w kontekście terapii genowych. Istotność tych badań potwierdzona została przez objęcie ich ochroną patentową. Sama zaś praca, pomimo pewnych

drobnych niedociągnięć, wynikających głównie z rozmiarów dysertacji i ilości prezentowanych w niej danych, pokazuje jednoznacznie, że mgr Żaneta Polańska jest niezwykle pracowitym, dociekliwym i świadomym młodym naukowcem, obdarzonym zdolnością do krytycznej ewaluacji otrzymanych wyników i użycia ich do planowania dalszych, samodzielnych badań.

Podsumowując, stwierdzam, że w przedstawionej mi do recenzji pracy spełnione zostały warunki zgodne z art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym i oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r, poz. 1789) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki UAM o dopuszczenie mgr Żanety Polańskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk fizycznych.

Aneta Szymańska