

Prof. dr hab. Józef Garbarczyk

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr inż. Żanety Polańskiej
z Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
**pt Układy samoorganizujące na bazie surfaktantów polimerycznych i formulacji
lipidowych, charakterystyka oraz zastosowanie do tworzenia stabilnych kompleksów z
kwasami nukleinowymi**

Praca doktorska Pani mgr inż. Żanety Polańskiej poświęcona jest analizie fizykochemicznej trimerycznych surfaktantów jako nośników kwasu nukleinowego w zastosowaniu do terapii genowej.

Tematyka rozprawy jest kolejnym bardzo interesującym zagadnieniem realizowanym od szeregu lat w Zakładzie Fizyki Biomedycznej na Wydziale Fizyki pod kierunkiem profesora Macieja Kozaka.

Terapia genowa to nowoczesna metoda leczenia polegająca na wprowadzeniu materiału genetycznego (DNA lub RNA) do komórek. Innymi słowy ma na celu naprawienie problemu genetycznego u jego źródła poprzez wprowadzenie nowego genu do organizmu lub na zastąpieniu zmutowanego genu jego zdrową kopią lub poprzez dezaktywację genu, który działa nieprawidłowo.

Jednym z ważnych czynników wpływających na skuteczność tej metody są wydajne i bezpieczne nośniki (tzw. wektory) materiału genetycznego.

Stosowane wektory wirusowe oparte np. na retro- i adenowirusach mogą wywoływać efekty uboczne w postaci cytotoksyczności, silnej odpowiedzi immunologicznej czy onkogenności. Dlatego w ostatnich latach trwają intensywne prace nad wektorami nie wirusowymi. Niewirusowe wektory do transfekcji efektywnie wiążą się z materiałem genetycznym, mają niemal nieograniczoną pojemność, są łatwe i tanie w produkcji. Przy tym są bezpieczne dla organizmu, charakteryzują się niską immunogennością.

Interesującą grupę związków, jako nośników stanowią surfaktanty, czyli czwartorzędowe sole amoniowe. Wśród tej grupy związków dobrze przebadane są tzw. układy gemini zawierające dwie grupy hydrofilowe i hydrofobowe łańcuchy połączone sztywnym, bądź bardziej podatnym na odkształcenia mostkiem.

Autorka recenzowanej pracy jako przedmiot swych badań obrała bardziej skomplikowane układy, a mianowicie surfaktanty trimerowe które zawierają trzy łańcuchy połączone trójczłonowym mostkiem 1,2,3-propanotrioksometylowym. Analizowane surfaktanty różnią się budową części hydrofobowej a mianowicie jeden zawiera łańcuchy alifatyczne dodecyloaminowe w drugim są cząsteczki aromatyczne dodecyloimidazolowe i w

trzecim typie są dodecylobenzimidazolowe. Kationy zlokalizowane są na aminie, imidazolu i benzimidazolu.

Praca zredagowana jest w sposób tradycyjny, czyli zawiera część wprowadzającą tzw. literaturową, rozdział objaśniający stosowane metody i opisem badanych substancji. W kolejnym rozdziale przedstawione są uzyskane rezultaty, dyskusja nad wynikami i wnioski. Ostatni rozdział to obszerna bibliografia, licząca 347 pozycji.

Wymienione rozdziały zostały opracowane bardzo starannie.

Zasadniczym celem tej pracy było opracowanie metod otrzymywania i ocena właściwości układów do transfekcji kwasów nukleinowych na bazie wymienionych powyżej kationowych surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych oraz zweryfikowanie ich potencjalnego zastosowania jako niewirusowych nośników do terapii genowej.

Dla osiągnięcia tego ogólnego celu autorka dążyła poprzez etapy pośrednie, więc ustalenie warunków tworzenia stabilnych kompleksów surfaktant/DNA oraz kompleksów fosfolipid/surfaktant/DNA, zbadanie konformacji kwasu nukleinowego w utworzonych kompleksach, wyznaczenie parametrów fazowych fosfolipidów w układach mieszanych fosfolipid/surfaktant oraz w układach fosfolipid/surfaktant/DNA a także określenie parametrów strukturalnych badanych układów i w końcu ocenę cytotoksyczności proponowanych nośników.

Należy podkreślić szeroką gamę zaawansowanych metod i technik badawczych, tak jak elektroforezę w żelu agarozowym, elektroforetyczne i dynamiczne rozpraszanie światła (ELS i DLS), testy cytotoksyczności MTT, analiza żywności komórek przy użyciu błękitu trypanu, spektroskopię dichroizmu kołowego (CD), spektroskopię podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS) oraz mikroskopię sił atomowych (AFM).

Zdolności do agregacji i micelizacji surfaktantów trimerycznych analizowano stosując konduktometrię, spektroskopię UV-Vis, spektroskopię fluorescencji, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS).

Należy dodać, że większość badań została przeprowadzona w Zakładzie Fizyki Biomedycznej, natomiast testy cytotoksyczności były wykonane w Zakładzie Bioenergetyki, Wydziału Biologii UAM, natomiast AFM w Politechnice Poznańskiej

Badane materiały otrzymano z innych ośrodków i tak surfaktanty z Politechniki Poznańskiej (Śp. Dr hab. Andrzeja Skrzypczaka), a fosfolipidy i kwasy nukleinowe były komercyjne.

Surfaktanty trimerowe to: trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloamoniowy) (TRI_N), trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecyloimidazoliowy) -(TRI_IM)], oraz trichlorek 1,2,3-propanotri[oksymetylo-3-(1-dodecylobenzimidazoliowy) -(TRI_BEN)..

Oprócz trimerów nośniki zawierały fosfolipidy z których dwa to pochodne fosfatydylocholiny 1,2-dimyristylo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina (DMPC), 1,2-dimyristylo-sn-glicero-3-fosfatydylocholina (DOPE), natomiast jeden to pochodna etanoloaminy 1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfatydyloetanoloamina (DPPC). Lipidy te różniły się budowa części hydrofobowej to znaczy w łańcuchu DOPE jest fragment nienasycony. Autorka stosowała trzy różne kombinacje lipidów: 10% DMPC określone jako L1, mieszaninę 9% DMPC i 1% DOPE (L2) oraz 4,5% DPPC i 4,5% DOPE (L3).

Testowano kompleksy z trzema rodzajami kwasów DNA o różnej długości, określone przez liczbę par zasad (pz) purynowych i pirymidynowych; najdłuższy zawierał 20 tysięcy pz (20kpz) oraz krótkie zawierające 185pz oraz 21 pz. Przygotowanie próbek do badań wymagało bardzo precyzyjnej preparatyki tak aby zachować odpowiedni współczynnik p/n. Parametr ten określa stosunek ładunków dodatnich pochodzących od cząsteczek surfaktantów do ładunków ujemnych pochodzących od cząsteczki DNA. Doktorantka stosowała 15 różnych wariantów stężeń surfaktantów dla których p/n wynosiło od 0,5 do 20.

Własności i właściwości fizykochemiczne przygotowanych preparatów analizowano stosując wymienione powyżej techniki pomiarowe. Aparatura i metody pomiarów zostały szczegółowo opisane w rozdziale 5.3.

Doktorantka przeprowadziła systematyczne i staranne badania poszczególnych elementów tworzących finalny kompleks. Poczynając od trimerów, poprzez fosfolipidy a kończąc na kompleksie surfaktant/fosfolipid /DNA.

Najpierw scharakteryzowano surfaktanty wyznaczając krytyczne stężenie tworzenia miceli (CMC), krytyczne stężenie agregacji (CAC) dynamiczny promień hydratacji (R_H) oraz liczbę agregacji (NA). Określano właściwości fizyczne takie jak przemiany fazowe lipidów, a przede wszystkim badano agregaty surfaktant/DNA i surfaktant/lipid/DNA pod kątem zdolności do kompleksowania i uwalniania kwasu nukleinowego. W kolejnych etapach analizowano wpływ surfaktantów i lipidów na konformację DNA, a także oceniono cytotoksyczność takich układów. Efekty pomiarowe prezentowane są w postaci wykresów, tabel i ilustracji, w sposób i jasny nie budzący żadnych wątpliwości.

Wyniki każdej grupy eksperymentów została szczegółowo ale też krytycznie objaśnione.

Poszerzone refleksje nad zarejestrowanymi rezultatami zawarte są w kolejnym siódmym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja i podsumowanie wyników”. Autorka analizuje i objaśnia zaobserwowane wyniki konfrontując z informacjami zawartymi w literaturze. Rozważania zostały podzielone na grupy ze względu na badany materiał i przeprowadzone pomiary.

Autorka podchodzi krytycznie do obserwowanych wyników, a różnice w wartościach pomiarowych objaśnia podając kilka możliwych wariantów. Przykładem może być analiza

micelizacji badanych surfaktantów. Doktorantka słusznie zauważa, że porównywanie z surfaktanami monomerycznymi jest dość ryzykowne, bowiem trzy łańcuchy połączone trójczłonowym mostkiem będą upakowywały się odmiennie niż pojedyncze. Dyskusyjne jest natomiast przywiązywanie większej wagi do oddziaływań π - π . Oczywiście π - π stacking pierścieni aromatycznych jest znany od wielu lat, lecz czy może mieć znaczenie w przypadku badanych związków? Czy protonowanie azotu w pierścieniu imidazolu nie osłabia aromatyczności tego związku? Autorka odwołuje się m.in. do pracy Jule Ma i współpracowników (w spisie biografii pozycja 309), lecz autorzy analizowali surfaktant, który w części hydrofobowej zawierał piren lub nawet dwie cząsteczki pirenu. Jest to jednak inna sytuacja i oddziaływanie π - π może mieć tam istotne znaczenie.

Należy podkreślić, że przedstawiona dyskusja nad wynikami jest obszerna, wnikliwa w każdym podrozdziale.

Bardzo ciekawe jest również to, że na zakończenie dyskusji autorka wskazuje jakie powinny być dalsze prace badawcze. Autorka stwierdza cytując: „Układy na bazie surfaktantów trimerycznych i formułacji lipidowych badanych w niniejszej pracy posiadają szereg unikatowych właściwości, które czynią je obiecującymi nośnikami kwasów nukleinowych. Choć podjęto próbę wytypowania układu o najlepszych właściwościach pod względem zastosowania jako niewirusowego nośnika, to wymaga on jeszcze dalszych badań pod kątem właściwości fizykochemicznych i biologicznych”

Świadczy to o szerokim a zarazem krytycznym spojrzeniu doktorantki na prezentowane tej rozprawie badania i dowodzi o pełnej dojrzałości naukowej kandydatki.

Podsumowanie całości badań zawarte jest w rozdziale zatytułowanym wnioski końcowe. Stwierdzam, że wnioski właściwe korespondują z osiągniętymi rezultatami. Wątpliwości budzi jedynie wniosek wskazujący na rolę oddziaływań π - π pierścieni aromatycznych, co opisałem powyżej.

Wyniki tych ważnych badań zostały zaprezentowane społeczności międzynarodowej poprzez publikacje i patent.

Mgr inż. Polańska jest współautorką kilku publikacji i jednego patentu. Zwłaszcza jedna praca opublikowana w 2021 roku poświęcona jest problematyce zbliżonej do tej, która jest przedmiotem jej rozprawy. Artykuł ten ukazał się w renomowanym czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Doktorantka jest pierwszą autorką. Pozostali współautorzy przekazali pisemne oświadczenia z których jasno wynika, że mgr Polańska odegrała znaczącą rolę w realizacji prezentowanych tam badań. Z drugiej strony taka wieloautorska praca świadczy o umiejętności współpracy w zespołach, zwłaszcza przy rozwiązywaniu tak trudnych zagadnień.

Metody otrzymywania wektorów niewirusowych są innowacyjne i oryginalne, stąd podjęto decyzję o zastrzeżeniu tych metod w urzędzie patentowym (PL 241612). Tytuł patentu

„Wieloskładnikowe niewirusowe układy do wiązania i transfekcji kwasów nukleinowych, sposób wytwarzania tych układów oraz zastosowanie do wprowadzania materiału genetycznego do żywych komórek” W mojej opinii ten patent jest też ważnym elementem w dorobku pani mgr Polańskiej

Z obowiązku recenzenta pozwolę wymienić kilka uwag dotyczących redakcji, a mianowicie.

1. pod ilustracjami wyników badań zauważyłem brak odnośników do wspomnianej powyżej publikacji z 2021 roku, a rysunki są identyczne.
2. Autorka stosuje wiele skrótów, brak zestawienia tych skrótów utrudnia czytanie pracy.
3. Zauważyłem wiele tzw literówek..

PODSUMOWANIE RECENZJI

Lektura rozprawy pozwala na stwierdzenie, że prezentowane rezultaty zawierają wiele nowych informacji, poszerzających a także pogłębiających wiedzę w zakresie nie wirusowych wektorów stosowanych w terapii genowej .

Wykonane bardzo skomplikowane eksperymenty, wraz z omówieniem rezultatów pomiarów, pozwalają wyrazić opinię, że mgr inż. Żaneta Polańska potrafi kompetentnie posługiwać się wieloma metodami badawczymi, a uzyskane wyniki właściwie i krytycznie interpretować.

WNIOSEK KOŃCOWY

Biorąc pod uwagę całość rozprawy, z przekonaniem wyrażam opinię, że przedstawione wyniki mają dużą wartość poznawczą ale też praktyczną, wskazującą na możliwość opracowania nowych wektorów w terapii genowej Praca zawiera wiele nowych oryginalnych obserwacji pozwalających lepiej zrozumieć procesy projektowania leków.

Bez wątpliwości stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia warunki przewidziane stosowną ustawą dla prac doktorskich i dlatego wnoszę do Wydziału Fizyki UAM o dopuszczenie magister inż. Żanety Polańskiej do kolejnych etapów postępowania kwalifikacyjnego oraz do publicznej dyskusji na temat rozprawy.

Jednocześnie wnioskuję, aby tę pracę uznać za wyróżniającą

Pomara, dnia 31.X.2014

