



Wrocław, 12.08.2019

Dr hab. Marek Lisowski
tel.: 71 375 7280
e-mail: marek.lisowski@chem.uni.wroc.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Nieścioruk
pt. „Biokoniugaty o potencjalnej aktywności antyangiogennej”

Choroby serca i układu krążenia znajdują się od wielu lat na pierwszym miejscu listy przyczyn zgonów. Jednakże w związku ze stale rosnącą liczbą zachorowań na raka, związaną m.in. z wydłużającym się okresem życia ludzkiego, jest całkiem możliwe, że w niedalekiej przyszłości choroby nowotworowe mogą wysunąć się na pierwsze miejsce w tym niechlubnym rankingu. Z tego względu badania, mające na celu wyjaśnienie mechanizmów powstawania tych chorób i metod ich zwalczania, mają bardzo duże znaczenie, przejawiające się w przeznaczonych na nie nakładach finansowych. Wiadomo, że znacznie lepiej jest zapobiegać przyczynom niż zwalczać skutki. W przypadku raka to pierwsze jest bardzo trudne do osiągnięcia. Główną przyczyną pojawiania się chorób nowotworowych są mutacje genetyczne. W organizmie ludzkim cały czas dochodzi do spontanicznych mutacji genetycznych, z których zdecydowana większość jest nieszkodliwa. Jednakże niektóre z nich mogą skutkować rozwojem choroby nowotworowej. Być może to się zmieni w przyszłości, ale obecnie nie mamy możliwości wpływania na mutacje genetyczne. W związku z tym główny wysiłek badaczy zajmujących się walką z rakiem jest skierowany na zwalczanie już rozwijających się chorób nowotworowych. Polega ono na doprowadzeniu do zniszczenia komórek nowotworowych, a jedną z metod stosowanych w tym celu jest uniemożliwienie rozwoju naczyń krwionośnych, czyli angiogenezy, w obrębie guza. Rozprawa doktorska mgr Nieścioruk wpisuje się właśnie w nurt takich badań, które mogą doprowadzić do opracowania skutecznych terapii chorób nowotworowych. W Pracowni Peptydów Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, kierowanym przez p. prof. Aleksandrę Misicką, są prowadzone od kilku lat badania nad syntezą analogów heptapeptydu o sekwencji H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, który spowalnia proces angiogenezy nowotworowej. Jednym z najaktywniejszych związków tego typu, otrzymanym w tej pracowni, jest H-Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg-OH. Synteza biokoniugatów, w których

skład wchodzi właśnie ten związek i wspomniany heptapeptyd, oraz badanie ich właściwości antyangiogennych, stanowią główny przedmiot rozprawy doktorskiej mgr Nieścioruk.

Na początku rozprawy Autorka umieściła rozdział „Założenia i cel pracy”. Przedstawiła w nim w jasny sposób krótkie wprowadzenie w tematykę swojej rozprawy i cele, które zamierzała zrealizować. Głównym celem była synteza koniugatów heptapeptydu H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH i peptydomimetyku H-Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg-OH z nanocząstkami magnetycznymi o potencjalnej aktywności antyangiogennej, polegającej na ich oddziaływaniu z receptorem komórkowym NRP-1 zaangażowanym w regulację angiogenezy. Koniugaty te miały zostać scharakteryzowane za pomocą określonych metod fizykochemicznych, a także przebadane pod kątem ich toksyczności na wybranych liniach komórkowych, normalnej i nowotworowej. Drugim celem recenzowanej rozprawy, nieco ubocznym w stosunku do pierwszego, ale ściśle z nim związanym, była synteza koniugatów heptapeptydu H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH z lekiem przeciwnowotworowym 5-fluorouracylem, co miało pozwolić na sprawdzenie, czy koniugat ten wpływa na zmniejszenie toksyczności 5-fluorouracylu w stosunku do komórek normalnych.

Kolejny, obszerny rozdział rozprawy, stanowi „Część teoretyczna”. Została w nim opisana chemioterapia stosowana przy leczeniu chorób nowotworowych i jej ograniczenia, wybrane przykłady nowoczesnych nośników służących do dostarczania leków do organizmu, mechanizmy dostarczania substancji terapeutycznych do tkanek docelowych i czynniki mające na nie wpływ, rodzaje połączeń leków z nośnikami oraz wybrane metody fizykochemiczne stosowane do badania nośników leków - spektroskopia w podczerwieni, skaningowa mikroskopia elektronowa, transmisyjna mikroskopia elektronowa, dynamiczne rozpraszanie światła i pomiary potencjału zeta. Te metody właśnie były stosowane przez Autorkę do badania otrzymanych koniugatów. Tematy poruszone w tej części rozprawy są przedstawione w wyczerpujący sposób i zilustrowane odpowiednimi rysunkami. Znajdują się w niej także tabele dostarczające dodatkowych, szczegółowych informacji dotyczących omawianych zagadnień.

W tym miejscu mam krytyczną uwagę co do kolejności dwóch powyższych rozdziałów. Uważam, że lepszym rozwiązaniem byłaby ich odwrotna kolejność, gdyż w rozdziale „Założenia i cel pracy” jest mowa o zagadnieniach, które są szczegółowo opisane w rozdziale „Część teoretyczna”, a więc czytelnik recenzowanej rozprawy, zapoznając się z jej celami, byłby już znacznie lepiej wprowadzony w jej tematykę.

Następna część rozprawy mgr Nieścioruk to rozdział „Badania własne”. Autorka opisała w nim na początku ogólny plan zamierzonych eksperymentów, podzielonych na 3 części, po czym opisała uzyskane wyniki. Ilość przeprowadzonych przez Autorkę syntez i badań otrzymanych związków jest duża i świadczy o znacznym nakładzie pracy włożonym w przygotowanie niniejszej rozprawy. Pierwsza część wykonanych doświadczeń wiązała się z syntezą analogów peptydomimetyku

H-Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg-OH, zawierających linkery z różnymi grupami funkcyjnymi (kwas pent-4-ynowy, reszta Cys i kwas 6-maleimidoheksanowy), które umożliwiły w dalszych etapach połączenie w różny sposób tych analogów z nanocząstkami - za pomocą pierścienia triazolowego, wiązania disulfidowego i tioeterowego. W ramach tej serii doświadczeń Autorka zsyntezowała także peptyd H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH i jego dwa analogi modyfikowane na N-końcu kwasem pent-4-ynowym i ugrupowaniem $H_2N-(PEG)_3$, co miało pozwolić na sprzęgnięcie tych pochodnych z nanocząstkami.

Druga część przeprowadzonych eksperymentów to synteza koniugatów nanocząstek magnetycznych z heptapeptydem H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH i peptydomimetykiem H-Lys(hArg)-Dab-Pro-Arg-OH o właściwościach antyangiogennych. Należało tutaj dobrać odpowiednie warunki tych syntez, obejmujące odczynnik sprzęgający, rozpuszczalnik, oraz sposób usuwania nieprzereagowanych substratów po zakończeniu reakcji, a także wybrać metody fizykochemiczne pozwalające na właściwe scharakteryzowanie otrzymanych połączeń. Ten etap badań był bardzo pracochłonny i wymagał przeprowadzenia przez Autorkę wielu eksperymentów. Do syntezy koniugatów wybrane zostały nanocząstki będące ferrytem niklowo-cynkowym o ogólnym wzorze $Ni_{0.5}Zn_{0.5}Fe_2O_4$, o powierzchni zmodyfikowanej kwasem sebacynowym (kwasem dekanodiowym). Ten rodzaj modyfikacji ferrytu niklowo-cynkowego nie był do tej pory opisany w literaturze. Dzięki obecności kwasu sebacynowego wspomniany heptapeptyd został przyłączony do nanocząstek za pomocą wiązania amidowego, natomiast jego pochodna z resztą kwasu pent-4-ynowego na N-końcu i peptydomimetyk za pomocą wiązania triazolowego, po uprzedniej reakcji kwasu sebacynowego z ugrupowaniem $H_2N-PEG(3)-N_3$. Koniugat zawierający heptapeptyd, związany z nanocząstkami za pomocą wiązania amidowego, okazał się wyraźnie cytotoksyczny w testach *in vitro*, przeprowadzonych na dwóch liniach komórkowych, normalnej i nowotworowej, w przeciwieństwie do nanocząstek modyfikowanych tylko kwasem sebacynowym jak i samego heptapeptydu, które nie wpływały na żywotność obu rodzajów komórek. Aktywność cytotoksyczna koniugatu nanocząstka-heptapeptyd była wyraźnie wyższa w stosunku do komórek normalnych niż nowotworowych. Przypuszczam, że wynik odwrotny byłby bardziej zadawalający dla Autorki, ale nie zawsze jest tak, jakbyśmy chcieli. Natomiast dziwi mnie trochę to, że analogicznym testom biologicznym nie został poddany koniugat nanocząstka-peptydomimetyk.

Trzecia część badań polegała na syntezie dwóch peptydowych pochodnych 5-fluorouracylu z heptapeptydem H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, różniących się łącznikiem między fluorouracylem a heptapeptydem. W pierwszej pochodnej tym łącznikiem był kwas octowy, w drugiej bursztynowy, co pozwoliło na połączenie fluorouracylu z resztą cząsteczki za pomocą odpowiednio wiązania amidowego i estrowego. Pochodne te zostały przebadane w testach *in vitro* na normalnej i nowotworowej linii komórkowej. Badania te wykazały, że pochodna z kwasem octowym jako linkerem jest nieaktywna w stosunku do obu linii komórkowych, natomiast pochodna, w której linkerem jest kwas bursztynowy, jest znacznie bardziej cytotoksyczna niż sam 5-fluorouracyl, co świadczy o tym,

że połączenie go z heptapeptydem H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH nie wpływa na zmniejszenie jego toksycznych właściwości w stosunku do komórek normalnych.

Kolejny rozdział rozprawy mgr Nieścioruk to „Część eksperymentalna”. Autorka opisała w nim szczegółowo wszystkie przeprowadzone przez siebie syntezy i pomiary oraz badania biologiczne, przeprowadzone przez mgr Annę Puszko w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Scharakteryzowała także wszystkie zsyntezowane związki za pomocą analitycznej wysokosprawnej chromatografii cieczowej i widm masowych, a w przypadku połączeń 5-fluorouracylu z kwasem octowym i bursztynowym także za pomocą widm $^1\text{H-NMR}$, jednak bez przypisania poszczególnych sygnałów odpowiednim protonom. Uważam, że ta część pracy zyskałaby na wartości, gdyby Autorka zamieściła w niej rysunki z chromatogramami HPLC oraz widmami masowymi otrzymanych związków. Brakuje mi tu także trochę ich analizy za pomocą NMR (poza pochodnymi fluorouracylu), oraz podania wydajności, z jakimi otrzymała syntezowane związki. Są one podane tylko dla pochodnych fluorouracylu. Natomiast moje uznanie wzbudza to, że w trakcie przyłączania $\text{H}_2\text{N-PEG}(3)\text{-N}_3$ do nanocząstek magnetycznych za pomocą wiązania amidowego oraz otrzymywania koniugatów nanocząstek z peptydami/peptydomimetykami mgr Nieścioruk operowała skutecznie bardzo małymi ilościami roztworów, rzędu dziesiątek i setek mikrolitrów, co świadczy o Jej dużych zdolnościach manualnych i dokładności.

Ostatnią część recenzowanej rozprawy stanowi „Podsumowanie”. Mgr Nieścioruk przedstawiła w nim uzyskane przez siebie wyniki. Generalnie jest to cenny fragment rozpraw doktorskich, gdyż pozwala zobaczyć w skondensowanej formie uzyskane przez ich autorów wyniki i osiągnięcia. Jest tak jednak wtedy, gdy jest napisany w zwięzły sposób. Moje zastrzeżenia odnośnie tej części rozprawy dotyczą tego, że jest po prostu za długa i zawiera szereg zbędnych, szczegółowych informacji, które były podane we wcześniejszych fragmentach pracy. Powoduje to, że prezentowane wyniki giną w nadmiarze tekstu, stając się przez to mniej widoczne.

Bibliografia, zamykająca rozprawę, zawiera 178 pozycji, z których wiele pochodzi z ostatnich lat. Wskazuje to na śledzenie przez Autorkę na bieżąco literatury naukowej i wykorzystywanie przez Nią w swojej pracy najnowszych osiągnięć, uzyskiwanych przez innych autorów.

Jeżeli chodzi o inne uwagi, poza tymi wyrażonymi wcześniej, to mam jeszcze następujące:

- a) na str. 79, 111, 112, i 116 Autorka używa określenia „bufor aktywujący” w odniesieniu do buforów PBS i MES. Nie za bardzo rozumiem, co kryje się pod tym pojęciem;
- b) w polskiej terminologii naukowej używa się raczej określenia „albumina surowicy wołowej” a nie „bydlęcej”, zgodnie z wiernym tłumaczeniem angielskiego określenia „bovine serum albumin”;
- c) przy opisie badań własnych i w części eksperymentalnej Autorka używa wielokrotnie skrótu ACN, nie znajdującego się w Wykazie skrótów na początku rozprawy. Nietrudno domyślić się, że chodzi tu o acetonitryl. Przypomina mi to moje własne doświadczenie, gdy kiedyś wysłałem do druku pracę z takim właśnie skrótem dotyczącym acetonitrylu i recenzent wytknął mi, że należy używać skrótu MeCN, a nie ACN. Tak że poddaję to Autorce pod rozważę;

d) na str. 21, 31, 37 i 39 Autorka używa wyrażenia „wiązanie disiarczkowe”. Poprawną formą jest „wiązanie disulfidowe”.

Recenzowana rozprawa, jak chyba w każdym takim przypadku, nie jest wolna od pewnych błędów językowych i edytorskich. Niektóre zdania są sformułowane w niezbyt poprawny sposób. Pięciokrotnie Autorka użyła określenia „własności” w miejscach, w których poprawnym słowem jest „właściwości”. Do błędów edytorskich recenzowanej rozprawy zaliczyć należy brak spacji lub ich niepotrzebną obecność w niektórych miejscach, pozostawianie na końcu wiersza pojedynczych liter oraz trafiające się gdzieśgdzie błędy literowe.

Powyższe krytyczne uwagi nie obniżają jednak dużej wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Nieścioruk. Autorka zrealizowała skutecznie postawione przed sobą cele. Uzyskała szereg cennych wyników, które stanowią istotny wkład do badań nad nanocząstkami - ich modyfikacjami i praktycznymi zastosowaniami. Uważam, że opracowanie przez mgr Nieścioruk metod otrzymywania biokoniugatów nanocząstka magnetyczna/peptyd lub peptydomimetyk stanowi jej duże osiągnięcie naukowe. Ma to znaczną wartość, gdyż nanotechnologia odgrywa coraz większą rolę w medycynie i farmacji, a także w innych dziedzinach nauki. W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr Nieścioruk spełnia wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym, jak również wymogi zwyczajowe. Dlatego stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie recenzowanej rozprawy oraz dopuszczenie mgr Anny Nieścioruk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Marek Lisowski