

Gdańsk, 06.09.2019

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Wioletty Liwińskiej
pt. „Systemy hydrożelowe modyfikowane oligonukleotydami
jako potencjalne nośniki leków”

Wstęp

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej Autorka skupiła się na syntezie i analizie właściwości nowych struktur tzw. „inteligentnych” hydrożeli, które mogą być dobrym medium dla kontrolowanych systemów dostarczania leków, w tym leków przeciwnowotworowych. Wynika to z ich „mobilnych” właściwości w zależności od warunków otoczenia. Atrakcyjność hydrożelu dla systemu dostarczania leków przeciwnowotworowych podwyższa modyfikacja cząsteczką DNA, która jest jednym z celów molekularnych dla tych leków. Kontrola struktury sieci hydrożelu pozwala wywoływać kontrolowane zmiany właściwości DNA, co daje duże możliwości uwalniania leku pod wpływem różnych bodźców z otoczenia. Poza tym, obecność „celu molekularnego” leku, jakim jest DNA pozwala uzyskać podwyższoną koncentrację tej cząsteczki w hydrożelowym nośniku.

Praca zrealizowana została na Wydziale Chemii UW w Pracowni Teorii i Zastosowań Elektrode w zespole naukowym kierowanym przez Pana prof. dr hab. Zbigniewa Stojka. Zespół od szeregu lat prowadzi badania przemian elektrochemicznych związków biologicznie czynnych, m.in. leków przeciwnowotworowych, zarówno w postaci wolnej jak i w postaci związanej z DNA oraz z nanocząsteczkami magnetycznymi na bazie tlenków żelaza. W ostatnich latach w kręgu zainteresowań zespołu znalazły się również elektrody modyfikowane polimerami i żelami wrażliwymi na parametry zewnętrzne, takie jak temperatura, siła jonowa, stężenie wybranych jonów itp. Podjęto też badania mikrożelowych kompozytów na bazie N-izopropylakrylamidu (NIPA), polimerycznego żelu, do którego wprowadzono związki typu ornityny i cystyny, polianiliny (PANI) czy diakrylową pochodną cystyny. Każdy z kompozytów miał realizować nieco inne cele. Praca Pani mgr Litwińskiej jest częściowo kontynuacją tych badań.

Celem recenzowanej pracy była wg Autorki synteza i możliwie szeroki opis właściwości wybranych kompozytowych nośników leków przeciwnowotworowych zawierających hydrożel NIPA i oligomery DNA. Materiały hydrożelowe otrzymano w skali makro i nano. Wydaje się jednak, że rzeczywisty cel, który w pracy zrealizowano sformułowany został w dalsze części pracy, gdzie wskazano na wybór nośników leku ukierunkowany z jednej strony na polimery wchłaniające jak największą ilość rozpuszczalnika, z drugiej na jak najwyższą akumulację leku Doxorubicyny pomiędzy

pary zasad DNA. W efekcie miałyby to prowadzić do nośnika zdolnego do przedłużonego i kontrolowanego uwalniania leku.

Charakterystyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera 195 stron maszynopisu, w tym 12 stron odnośników literaturowych zawierających 265 pozycji. Tekst pracy podzielony jest na 16 rozdziałów, przy czym pierwszy z nich to wstęp z celem pracy, a pozostałe zostały podzielone na dwie części: „Część teoretyczną” od rozdziału 2 do 5 oraz „Część eksperymentalną” od rozdziału 6 do 14. Część teoretyczna, stanowiąca przegląd aktualnej literatury związanej z tematyką rozprawy jest dość obszerna. Zawiera na prawie 50 stronach ogólny opis nośników leków, po czym bardziej szczegółowo przybliży czytelnikowi właściwości hydrożeli polimerowych, w tym hydrożeli modyfikowanych DNA, wprowadzając następnie w świat nano- i mikrożeli. Tzw. „inteligentne” nanożele reagują zmianą rozmiarów i struktury wewnętrznej na zmianę czynników zewnętrznych i mogą być efektywnie transportowane przez naczynia włosowate i uwalniane w miejscu docelowym organizmu z odpowiednią szybkością. Ostatni rozdział części teoretycznej charakteryzuje cząsteczkę DNA w aspekcie jej przydatności w systemie kontrolowanego dostarczenia leku. Jest jednak napisany w sposób zbyt podstawowy. Np. str. 57: wspomniany „centralny dogmat biologii molekularnej” nie ma wpływu na strukturę DNA, str. 58-59: helisy A, B, Z są wyidealizowanymi modelami struktury dsDNA, a szczególnie w roztworach (gdź w układach biologicznych jest to struktura dynamiczna i zmienna w czasie); dalej, rys.14 źle oddaje naturę procesu interkalacji, nie obrazuje lokalnej zmiany geometrii podwójnej helisy.

Cała część teoretyczna, oparta jest na ponad 240 odnośnikach do prac oryginalnych i generalnie napisana wyczerpująco, wprowadzając czytelnika w świat inteligentnych nośników leków. Zakładam, że brak odnośników literaturowych w podpisach pod niektórymi rysunkami wskazuje, że są oryginalnymi prezentacjami Doktorantki.

Druga część pracy nazwana *Częścią eksperymentalną* ma układ nietypowy, przyporządkowano jej 9 rozdziałów od 6 do 14, przy czym brakuje tam wydzielonego rozdziału poświęconego opisowi WYNIKÓW i DYSKUSJI wniosków. Opisy aparatury, rozdział 6, i procedur doświadczalnych, rozdział 7, zostały połączone z opisem otrzymanych wyników, w rozdziałach 8 i 9, przy czym brak dyskusji wniosków został zastąpiony podrozdziałami pt. „Podsumowanie” i rozdziałem 10. „Końcowe wnioski”. W takiej sytuacji rozdziały 11 i 12, będące streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim, rozdz.13: Spis publikacji autora i 14: Literatura, powinny być wydzielone z części eksperymentalnej. W ramach opisu procedur w rozdziale 7 Autorka bardzo solidnie przedstawiła fizykochemiczne podstawy stosowanych w pracy metod. Od technik spektroskopii UV-Vis i podczerwieni (FTIR) poprzez dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) i różne rodzaje mikroskopii elektronowej (TEM, SEM) Opisane też zostały metody voltamperometrii (CV i SWV) oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Opisano więc szeroki wachlarz metod o różnych podstawach teoretycznych, co świadczy o szerokim zakresie możliwości i umiejętności eksperymentalnych Pani Liwińskiej. Brak jest jednak opisu metod stosowanych do oceny efektów hamowania wzrostu komórek.

Otrzymane wyniki

Rozdział 8, pt. „Hydrożele modyfikowane DNA w skali makro” oraz rozdział 9, pt. „Nanohydrożele modyfikowane DNA” to główne części pracy prezentujące jej wyniki. Zakładam, że pierwszy etap pracy, eksperymenty z hydrożelami w skali makro był etapem wstępnym do właściwych badań z nanohydrożelami. Opisano w nim syntezę hydrożeli sieci PAM w obecności inicjatora APS i akceleratora TEMED. Oligonukleotydy wprowadzono do hydrożelu na etapie polimeryzacji. Po odmyciu substratów i katalizatorów polimeryzacji finalne stężenie dsDNA wynosiło 40,3, a ssDNA 30,5 mikroM par zasad. Badania morfologii wykonane techniką SEM wskazały, że materiały oparte na dsDNA charakteryzowały się mniejszą średnicą porów od pozostałych. Zależność otrzymana z woltamogramów SW pozwoliła na wniosek, że odpowiedź prądowa ma bardziej charakter dyfuzyjny dla ssDNA i dsDNA unieruchomionego w PAM niż dla dsDNA w roztworze. Kolejny wynik wskazuje, że matryca hydrożelowa utrudnia dostęp do nici DNA. Następnie zbadano proces uwalniania leku modelowego, Doxorubicyny, z matrycy żelowej pod wpływem temperatury. Najwięcej leku akumulowało się i uwolniało z hydrożeli dsDNA/PAM, a najmniej dla wolnego DNA. Wyniki wskazały na dyfuzyjny mechanizm uwalniania leku po czasach do 24 godzin i w temp. 37°C dla wszystkich typów matryc.

W głównym etapie pracy (punkt 9) Doktorantka skupiła się na nanohydrożelach sieci poli(N-izopropylakrylamidu) (PNIPA) z kwasem akrylowym (AAc) modyfikowanych kowalencyjnie wbudowanymi nićmi ssDNA i dsDNA. Syntezę żeli prowadzono w trzech typach eksperymentów: (1) z zastosowaniem standardowego środka sieciującego N-metylenobisarylamidu, (2) bez kowalencyjnego środka sieciującego, ale w obecności dwóch niekomplementarnych odcinków ssDNA zakończonych od strony końca 5' grupą akrylową, które po zakończeniu polimeryzacji mogły ulegać hybrydyzacji z trzecim oligonukleotydem komplementarnym do obu wbudowanych sekwencji oraz (3) z trzecim odcinkiem DNA zmodyfikowanymi mostkami disiarczkowymi S-S, które rozszczepiały się pod wpływem np. glutationu.

W pierwszym typie eksperymentów (pkt 9.1) zsyntetyzowano różne typy nanożeli, usieciowane N-metylenobisakryloamidem które zawierały poza tym kowalencyjnie wprowadzone oligonukleotydy: PNIPA-AAc-oligo12. Po syntezy i oczyszczeniu przeprowadzono proces hybrydyzacji otrzymując nanożel PNIPA-AAc-oligo123. Widmo FTIR potwierdziło obecność odpowiedniego polimeru, a wartości potencjału zeta wskazały na jego wysoką stabilność. Dalsze badania potencjalnych nośników z tej grupy obejmowało szczegółową analizę objętościowego przejścia fazowego (zmiana promienia hydrodynamicznego, D_h , i zmiana potencjału zeta w funkcji temperatury). Za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, (widm EIS) i wykresów Nyquista wykazano, że hybrydyzacja DNA jest trójsegmentowa. W kolejnym etapie analizowano akumulację i oddziaływanie lek-DNA. Największa ilość leku została zakumulowana w nanożelach PNIPA-AAc-oligo123, ale nanożele PNIPA-AAc również, chociaż słabo, zatrzymywały lek w swojej strukturze. Również badania cytotoksyczności wobec komórek nowotworowych Hela i Insulinoma wskazały, że nośnik PNIPA-AAc-oligo123 jest najskuteczniejszy z punktu widzenia cytotoksyczności Doxorubicyny.

Wyniki kolejnego typu eksperymentu przedstawiono w podrozdziale 9.2. Nanożel PNIPA-AAc usieciowany był tylko trójsegmentową hybrydą DNA. W tym przypadku również akumulacja leku zachodziła dzięki jego oddziaływaniu z DNA. Syntezę polimerów i charakterystykę właściwości nanożelowych polimerów przeprowadzono podobnie, natomiast skupiono się na uwalnianiu leku pod wpływem wzrostu temperatury, dlatego badania prowadzono w szerszym zakresie temperatur niż poprzednio: 25, 37, 45 oraz 70°C. Wykazano, że w przedziale niższych temperatur: 37 - 45°C zmiany rozmiaru i potencjału zeta miały charakter odwracalny, natomiast w wyższych temperaturach były nieodwracalne, co potwierdzono za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej, DSC. Wartości parametrów charakteryzujących oddziaływanie lek-dsDNA równe $K_1 = 2,07 \times 10^6$ i $n_1 = 2,15$ sugerują, że preferowanym typem wiązania Dox z dsDNA jest interkalacja pomiędzy pary zasad.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka zsyntetyzowała nanożele PNIPA-AAc sieciowane oligonukleotydem zawierającym ugrupowanie S-S. Sposób syntezy i polimeryzacji nanożeli prowadzono analogicznie jak w dwóch poprzednich układach, po czym następował proces hybrydyzacji komplementarnego odcinka DNA z wbudowanym mostkiem S-S do otrzymania struktur PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA. Wydaje się, że wydajność hybrydyzacji dla tego typu nanożeli była wyższa. Podobnie jak poprzednio dsDNA stanowił miejsce wiązania Doxorubicyny, a testowano uwalnianie leku w warunkach podwyższonego stężenia GSH. Akumulację interkalatora Dox badano spektrofotometrycznie i wykazano, że najwyższa jest dla cząsteczek zawierających mostki disiarczkowe, chociaż nie tak wysoka jak dla poprzednich nanożeli sieciowanych trójsegmentową hybrydą DNA. Poza tym wartości stałych wiązania wskazały, że oddziaływania typu interkalacyjnego są silniejsze od elektrostatycznych, podobnie jak to wykazano wcześniej dla nanożeli usieciowanych łańcuchem DNA, PNIPA-AAc-123cross. Z kolei uwalnianie Dox z PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA analizowano, jak powyżej, woltamperometrycznie (SWV) i zaobserwowano istotną rolę w tym procesie obecności GSH zarówno w temp. 37 jak i 45°C.

Uwagi dotyczące interpretacji wyników i edycji

Generalne zastrzeżenia merytoryczne budzi czasami sposób interpretacji wyników, przy czym nie dotyczy to wyników analiz chemicznych i fizykochemicznych, natomiast związane jest z analizą procesów zachodzących w usieciowanych nanożelach czy z wnioskami dotyczącymi konsekwencji biologicznych otrzymanych wyników. Poniżej przedstawiam kilka przykładów i proszę o odpowiedź na uwagi.

(i) rozdział 8.1.3. Zgadzam się z Autorką, że wyniki wskazują na możliwość trwałego unieruchomienia dsDNA w matrycy polimerowej bez tworzenia wiązań kowalencyjnych. Nie można natomiast twierdzić, że akumulacja doksorubicyny w hydrożelach PAM/DNA zachodzi poprzez interkalację do podwójnej helisy, gdyż (jak przedstawiono wcześniej w części teoretycznej) znane są inne mechanizmy fizykochemicznego oddziaływania leków, w tym doksorubicyny, z dsDNA.

(ii) rozdział 9.2.8. Cennym wnioskiem tego etapu pracy jest stwierdzenie wyższej akumulacji leku dzięki zastosowaniu sieciowania za pomocą odcinków DNA. Natomiast dalsze wnioski o mechanizmach uwalniania doksorubicyny w zależności od temperatury są raczej przypuszczeniem. Zbyt odważne jest też stwierdzenie o udowodnieniu całkowitego bezpieczeństwa nanożeli dla organizmu. Wykazano tylko brak cytotoksyczności wobec komórek Insulinoma .

(iii) rozdział 9.3.1. Schemat syntezy pokazany na Rys.71B jest niejednoznaczny jeśli chodzi o umiejscowienie wiązania S-S i niezgodny z opisem nukleotydu Oligo5 w tabeli 3.

(iv) rozdział 9.3.4. Opis wyników pokazanych na rys.76 charakteryzuje się nadinterpretacją. Dotyczy to szczególnie przypuszczeń niepopartych danymi doświadczalnymi, np. „Związane to było z deprotonacją grup karboksylowych w sieci oraz grup fosforanowych obecnych w DNA.” czy „Wyniki te potwierdzają użyteczność nanożeli PNIPA-AAc-PEG-SS-dsDNA z tytułu istotnie zwiększonego uwalniania leku dopiero w komórkach nowotworowych”.

Strona edytorska pracy, poza przedstawionymi powyżej uwagami, co do jej układu (np. brak wyraźnie zaznaczonej części „Wyniki”) jest staranna, zarówno w zakresie tekstu jak i części graficznej. Poniżej, z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi z zakresu edycji:

- w części eksperymentalnej zabrakło opisu badania cytotoksyczności;
- praca nie zawiera wykazu skrótów;
- podpisy tabel umieściłabym nad tabelą a nie pod tabelą;
- str. 143, Rys.62, błąd w skali temperatury, powinno być od 45 do 70 stopni;
- str. 171 i inne „niszczenie komórek nowotworowych” zastąpić należy: „hamowanie wzrostu komórek nowotworowych”;
- nić DNA jest „rozplataną” a nie „rozplątywaną”
- raczej polimery „wrażliwe” na warunki środowiska, a nie „czułe” na warunki środowiska,
- „stosowana” metoda, a nie „używana” metoda,
- temperatura „obniża się”, a nie „zmniejsza się”.
- za niepotrzebną uważam numerację 8.1.1., 8.1.2. itd. zastąpiłabym ją: 8.1., 8.2., itd

Wnioski końcowe

Podsumowując, recenzowana praca doktorska prezentuje wysoki poziom przeprowadzonych badań. Wskazuje na kompetencje Doktorantki w zakresie fizykochemii i stosowanych w tej dziedzinie najnowszych technik eksperymentalnych, jak i na otwartość w kierunku wiedzy o funkcjonowaniu organizmów żywych. Dało to efekt w koncepcji roli DNA w procesie akumulacji i uwalniania leku przeciwnowotworowego, którą oceniam bardzo wysoko. Wyniki recenzowanej pracy zostały opisane w czterech publikacjach, w których Doktorantka jest pierwszym autorem i w trzech gdzie jest drugim współautorem.

Stawiam wniosek, że rozprawa Pani Liwińskiej pt. „Systemy hydrożelowe modyfikowane oligonukleotydami jako potencjalne nośniki leków” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Wioletty Liwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

