

POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,
tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Macieja Cieślaka

Magister Maciej Cieślak swoją pracę doktorską zatytułowaną „Synteza i właściwości peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola”” wykonał w Instytucie Chemii Organicznej PAN pod opieką prof. dr hab. Zofii Lipkowskiej.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy dendronów i dendrymerów peptydowych i ich prób zastosowania jako układów działających na układ nerwowy. Dendrymery peptydowe zbudowane są z aminokwasów, co gwarantuje brak cytotoksyczności oraz biokompatybilność a jednocześnie są trwałe w fizjologicznym środowisku człowieka i nie ulegają degradacji pod wpływem enzymów. Dendrymery peptydowe są strukturami charakteryzującymi się rozgałęzioną, trójwymiarową budową, gdyż zawierają one wielofunkcyjny rdzeń, od którego promieniście odchodzą ramiona dendrymerów (dendrony), zawierające różnorodne grupy funkcyjne, które mogą być zastosowane do dalszej modyfikacji. Dendrymery mogą być stosowane jako nośniki różnorodnych związków chemicznych o zdefiniowanej aktywności farmakologicznej, tym samym można je zakwalifikować do grupy transporterów leków (DDS, Drug Delivery System). Co istotne biologicznie aktywne związki mogą być umieszczane na powierzchni dendrymeru (poprzez wykorzystanie grup funkcyjnych) albo we wnętrzu na drodze enkapsulacji. Ponadto dendrymery łatwo przenikają przez błony komórkowe, co dało początek ich wykorzystaniu jako transporterów DNA, RNA i siRNA. Poliwalentna budowa dendrymerów pozwala na ich zastosowanie jako systemów do otrzymywania szczepionek nowej generacji. Dendrymery same w sobie mogą mieć działanie lecznicze, co jest związane z ich zdolnością do oddziaływania z białkami. Obecnie dendrymery są intensywnie badane pod kątem ich zastosowania w leczeniu infekcji, chorób neurodegeneracyjnych i wielu innych. Przedstawione fakty bezsprzecznie wskazują na aktualność kierunku badawczego podjętego przez Doktoranta.

Praca posiada wielopoziomą strukturę, konsekwentnie dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej profesor Zofii Lipkowskiej.

Opracowanie metody syntezy peptydowych dendronów i dendrymerów o strukturze „bola” oraz zbadanie ich właściwości fizykochemicznych i oddziaływania ze zdrowymi i chorobowo zmienionymi komórkami układu nerwowego wymagało realizacji badań wielopoziomowych, dlatego też główny cel pracy mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych obejmujących: 1) optymalizację metody otrzymywania związków o strukturze „bola” z wykorzystaniem metod na fazie stałej i w roztworze, dobranie sposobu ich oczyszczania i metod charakteryzowania; 2) zaprojektowanie i otrzymanie łączników trwałych chemicznie (ulegających trudno degradacji) jak też związków które łatwo ulegają degradacji na mniejsze fragmenty w obniżonym pH (charakterystycznym dla komórek nowotworowych) czy też pod działaniem glutationu (warunki redoks); 3) zbadanie cytotoksyczności uzyskanych związków wobec linii komórkowych glejaka i komórek niezmiennych chorobowo neuronów, a także zbadanie potencjału peptydowych dendronów i ich dimerów o strukturze „bola” jako związków transporterowych; 5) sprawdzenie wpływu uzyskanych związków na procesy utleniania/redukcji z wykorzystaniem testów FRAP i CUPRAC) oraz ABTS i DPPH; 6) sprawdzenie zdolności oddziaływania wybranych dendronów z modelowymi polipeptydami stosowanymi w badaniach nad samoagregacją polipeptydów/białek do struktur amyloidowych.

Recenzowana praca liczy 143 strony. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje wykaz skrótów i oznaczeń, streszczenie, wstęp literaturowy, hipotezę naukową, cel i zakres pracy, badania własne, podsumowanie i wnioski, część eksperymentalną, literaturę cytowaną. Pierwszą część pracy stanowi suplement, w którym przedstawiony jest dorobek naukowy Doktoranta.

Rozdział pierwszy „Streszczenie” przedstawia w zwięzły sposób zakres zrealizowanych prac badawczych. Rozdział trzeci „Wstęp literaturowy” obejmuje podrozdziały dotyczące: struktury, metod otrzymywania i właściwości dendrymerów i dendrymerów peptydowych, zastosowaniu dendrymerów jako nanonośników, wykorzystaniu dendrymerów w leczeniu chorób układu nerwowego, związków o właściwościach antyoksydacyjnych i ich koniugatów z dendrymerami oraz ich roli w procesie nowotworzenia i leczeniu chorób nowotworowych. Rozdział ten liczy 36 stron i zawiera 124 odnośniki literaturowe. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego, utrzymane jest podporządkowanie wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie wysokiej oceny tej części rozprawy. Doktorantowi niestety nie udało się uniknąć błędów językowych, edytorskich oraz żargonu. Przykładowo: sztuczne białko, skuteczne zabijanie bakterii,

membrana drobnoustrojów (powinno być precyzyjnie przedstawione czy jest to ściana, czy błona komórkowa), fluorowęgla, brak objaśnień (np. na rysunku 9 brak informacji, czym jest Y), zróżnicowane zapisywanie autorów cytowanych prac (podawane jest imię i nazwisko lub inicjały i nazwisko). W moim przekonaniu schemat syntezy peptydów na nośniku stałym (rysunek 8) jest zbędny. Metoda ta jest powszechnie znana i stosowana z powodzeniem od wielu lat.

Ostatni akapit rozdziału 5 „Związki o właściwościach antyoksydacyjnych, w tym koniugaty dendrymer – antyoksydant oraz ich rola w procesie nowotworzenia i leczenia nowotworów” raczej nie jest stanem wiedzy literaturowej, ale zapowiedzią planowanych w ramach doktoratu badań.

Lektura tej części pracy nasunęła mi kilka pytań, na które chciałabym uzyskać odpowiedź w trakcie publicznej obrony.

- 1) Czy dendrymery peptydowe zawierające reszty lizyny lub argininy można z punktu widzenia zdolności oddziaływania z błonami komórkowymi i zdolności ich przenikania przez błony komórkowe, porównać/odnieść do powszechnie stosowanych peptydów penetrujących błony komórkowe (CPP). Która grupa dodatkowo naładowanych peptydów jest bardziej użyteczna jako transporter/nośnik różnego rodzaju związków do komórki?
- 2) Doktorant pisze, że „dendrymery o małych rozmiarach mogą wnikać głębiej i uzyskać bardziej rozległą dystrybucję niż nanocząstki o konwencjonalnej wielkości”, proszę o przedstawienie porównania wielkości cząstek w zależności właściwości dotyczących dystrybucji tkankowej i efektywności docierania do określonego miejsca w organizmie.
- 3) Intrygujące jest również stwierdzenie że dendrymery peptydowe otrzymywane są na drodze dobrze poznanych wysokowydajnych i stereoselektywnych metod syntezy peptydów. Cóż znaczą te stereoselektywne metody?

Drugi rozdział główny to „Hipoteza Naukowa, Cel i Zakres Pracy”, rozdział ten napisany jest w sposób klarowny. Na pochwałę zasługuje również krótki opis planowanych do zastosowania metodyk badawczych.

Kolejny rozdział to „Badania Własne” liczący 41 stron. Pierwszy etap pracy badawczej dotyczył syntezy dendronów peptydowych (na bazie lizyny lub ornityny) oraz dendronów sfunkcjonalizowanych pochodnymi kwasu cyjanonowego i pochodnymi imidazolu. Reakcje przeprowadzono zarówno metodą syntezy w roztworze jak i na nośniku stałym, co pozwoliło na opracowanie optymalnych warunków syntezy dendronów

peptydowych. Kolejny etap badań dotyczył opracowania syntezy peptydowych dendrymerów typu „bola” zawierających trwałe i degradowalne łączniki organiczne. Zoptymalizowana metoda syntetyczna obejmuje: 1) otrzymanie zabezpieczonego dendronu, 2) jego reakcję z odpowiednim łącznikiem organicznym, co prowadzi do wytworzenia rdzenia dendrymeru typu „bola”, 3) końcową funkcjonalizację. Dla wybranych 56a, 58a, 55a i 57a wykonano badania właściwości antyoksydacyjnych. Doktorant stwierdził że, dendrymery „bola” zawierające histydynę charakteryzują się wysoką zdolnością do redukcji, zaś zawierające prolinę są efektywniejszymi wygaszaczami wolnych rodników. Przeprowadzone zostały również badania nad zdolnością kompleksowania leków stosowanych w terapii onkologicznej przez uzyskane dendrymery typu „bola”. Dendrymer zawierający reszty proliny (związek 55a) kompleksuje wszystkie testowane leki (cytarabina, temozolomid, chlorambucil), natomiast dendrymer modyfikowany resztami histydyny (związek 58a) kompleksuje chlorambucil. Wstępne badania wskazują, że dendrymery „bola” w stężeniu 50 μM wykazują silniejszy efekt biologiczny niż temozolomid.

Aktywność przeciwnowotworowa związków 23, 43, 55a, 57a, 56aa i 58a badana była na modelu komórek glejaka U87 i T98G. Uzyskane wyniki badań biologicznych wskazują, że dimeryzacja dendronu zwiększa jego aktywność, zaś ładunek i budowa modulują aktywność biologiczną. Dla związków 57a i 58a różniących się obecnością reszt prolinowych i histydynowych, stwierdzono, że reszty histydynowe wzmacniają aktywność antyproliferacyjną związku 58a w modelu T98G, zaś związek 57a zawierający reszty proliny wykazuje podobną aktywność proapoptotyczną co związek 58a. Co istotne związek 58a charakteryzuje się wyższą aktywnością biologiczną względem bardziej opornego modelu glejaka T98G. Zgodnie z oczekiwaniami, stwierdzono, że lepsza przenikalność przez błony komórkowe związków dendrymerycznych, przekłada się na ich wyższą aktywność przeciwnowotworową. Natomiast zdolność penetracji błony komórkowej zależy od ładunku dendrymerów, charakteru amfifilowego i ciężaru cząsteczkowego.

Również w tym rozdziale Doktorantowi nie udało się uniknąć błędów i określeń żargonowych, np. charakterystyka śmierci komórek (strona 87), odnośnik do publikacji 123 na stronie 85. Przedstawione powyżej uwagi krytyczne w żaden sposób nie obniżają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy.

Lektura tej części pracy nasunęła mi jeszcze jedno pytanie/uwagę, które chciałabym aby Doktorant przedyskutował w trakcie publicznej obrony pracy:

- 1) Czym może być spowodowane tak ogromne zróżnicowanie wydajności syntez dendronów i dendrymerów?

Rozdział czwarty „Podsumowanie i wnioski” przygotowany został klarownie i nie budzi zastrzeżeń.

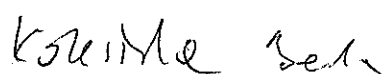
Rozdział piąty „Część eksperymentalna” opisany jest poprawnie. Procedury i protokoły przedstawione zostały w sposób umożliwiający ich odtworzenie. Jedynie czego mi zabrakło, to warunków analiz HPLC docelowych związków przedstawionych w pracy na stronach (134-136).

Zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmuje 127 pozycji. W tym miejscu muszę niestety stwierdzić, że opis odnośników literaturowych jest wyjątkowo niestaranny (brak jednakowego sposobu zapisu).

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych, które Doktorant potrafił zaimplementować w badaniach. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktoranta.

Na dorobek publikacyjny mgr Macieja Cieślaka składa się dwie publikacji z listy JCR, dwie publikacje o zasięgu krajowym, zgłoszenie patentowe. Pan Maciej Cieślak jest również współautorem 16 komunikatów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych. Doktorant brał udział w realizacji projektu Opus 10, pt. „Projektowanie i synteza pH-lub redox-czułych dimerycznych dendronów jako nanonarzędzia do transportu siRNA lub leków do komórek glejaka”

Podsumowując, pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Macieja Cieślaka. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki. Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Macieja Cieślaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska