

**Recenzja rozprawy doktorskiej Klaudii Kwiecińskiej
pod tytułem
„Czerwień Kongo jako modelowy supramolekularny układ nośnikowy
do transportu leków”
wykonanej pod kierunkiem promotorów: prof. dr. hab. Jacka Korchowca z Wydziału
Chemii UJ oraz prof. dr hab. Ireny Roterman-Koniecznej z Wydziału Lekarskiego UJ**

Transportu leku do wnętrza komórki biologicznej jest jednym z podstawowych problemów farmakologii. Powagę tego zagadnienia uświadamia stosowanie chemioterapeutyków w terapii nowotworowej. nierozwiązany dotychczas problem selektywnego działania leku tylko na komórki nowotworowe prowadzi do ubocznych, negatywnych skutków leku na pozostałe komórki w organizmie chorego. Jednym z rozwiązań jest metodą zwiększającą efektywność dostarczania leku poprzez zastosowanie nośnika ułatwiającego przenikanie leku do wnętrza komórki. Poszukiwanie odpowiedniej cząsteczki pełniącej rolę nośnika jest trudne z powodu wielu czynników grających kluczową rolę w tym procesie. Pewne nadzieje budzą układy klatkowych cząsteczek, wewnątrz których umieszczane są cząsteczki leku. Testowane są też możliwości zastosowania nanocząstek, np. fulerenów i nanorurek węglowych, do których adsorbowane są molekuly aktywne biologicznie. Podstawową cechą takich układów jest ich nietoksyczność i krótka retencja w organizmie chorego. Układ molekularny lek-nośnik musi oddziaływać z błoną komórkową, tak by efektywnie umożliwić transport leku do wnętrza komórki jednocześnie nie destabilizując błony. Złożoność zagadnień związanych z układami nośników leków wymaga wielostronnego podejścia z zastosowaniem wielu zaawansowanych technik badawczych. Niezwykle pomocne są obliczenia oparte o metody chemii kwantowej i symulacje komputerowe dynamiki molekularnej. Przeprowadzenie wiarygodnych obliczeń wymaga dużej wiedzy na temat oddziaływań fizycznych pomiędzy cząsteczkami, znajomości technik obliczeniowych oraz doświadczenia w poprawnej interpretacji wyników obliczeń komputerowych.

Doktorantka realizowała swoją pracę doktorską w ramach Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” na Uniwersytecie Jagiellońskim.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest w charakterze klasycznej monograficznej pracy składającej się z 7 ponumerowanych rozdziałów: Wstęp – wprowadzający w problematykę chemioterapeutyków stosowanych w terapii nowotworowej, Cel badań – zwięzłe przedstawienie problemu badawczego, Materiały i odczynniki – przedstawiający właściwości badanych cząsteczek oraz stosowanie odczynniki, Metody badawcze – obszernego rozdziału omawiającego stosowane w pracy metody obliczeniowe oraz użyte techniki eksperymentalne, Wyniki i wnioski – najważniejsza część pracy omawiająca rezultaty badań oraz ich interpretację, Dyskusja – rozdział będący szerszym podsumowaniem osiągniętych rezultatów, Podsumowanie – stwierdzenie o osiągnięciu założonego celu rozprawy. Ponadto rozprawa zawiera: Wykaz skrótów, Streszczenie, Abstrakt, Bibliografię (103 pozycje) oraz wykaz publikacji autorki. Cała praca zawarta jest na 104 ponumerowanych stronach, zawiera 39 wzorów, 33 rysunki i 3 tabele.

Celem pracy doktorskiej jaki sobie postawiła Doktorantka było sprawdzenie czy układy supramolekularne Czerwieni Kongo (CR) mogą stanowić nośnik chemioterapeutyku. Doktorantka postanowiła dogłębnie poznać mechanizmy prowadzące do aglomeracji agregatów CR z doksorubicyną (DOX) – powszechnie stosowanym cytostatykiem, wpływ tych układów na lipidową błonę biologiczną, przenikanie DOX do wnętrza komórki oraz sprawdzenie *in vivo* skuteczności działania na liniach komórek nowotworowych sutka MCF7 i pęcherza moczowego T24. Badania miały sprawdzić ogólną przydatność układów supramolekularnych do efektywnego transportu leku do wnętrza nieprawidłowych komórek. Dla osiągnięcia celu zaplanowano wnikliwą analizę oddziaływań pomiędzy cząsteczkami CR i DOX z zastosowaniem obliczeń kwantowo-mechanicznych, symulacji dynamiki molekularnej oraz eksperymentalną analizę wpływu układów CR/DOX na właściwości monowarstwy lipidowej DPPC utworzonej na granicy faz powietrze-woda.

We wstępie rozprawy (rozdział 1. Wstęp) Doktorantka przedstawia podstawowe cechy badanych cząsteczek i ich rolę w terapii nowotworowej. Szkoda, że na Rys. 1 zaprezentowana jest tylko struktura cząsteczki CR bez pokazania struktur supramolekularnych, o których w całej rozprawie ciągle dyskutuje. W literaturze opisana jest tendencja CR do agregacji i tworzenia długich przypominających taśmy struktur złożonych z równoległe ułożonych molekuł powstających dzięki oddziaływaniom orbitali molekularnych $\pi-\pi$ sąsiadujących molekuł. Tego typu oligomery mają elastyczną strukturę wykazującą dużą powinowatość do białek i błon biologicznych. Zdolne są też do interkalacji cząsteczek o małej masie molekularnej. Złożoność procesów agregacji (dimeryzacji) cząsteczek CR i DOX oraz wnikania molekuł DOX do struktur CR wymaga bardzo wnikliwej analizy oddziaływań pomiędzy poszczególnymi atomami i fragmentami cząsteczek. Na początku XXI wieku prowadzono badania CR komplementarnymi metodami między innymi w zespole prof. I. Roterman-Koniecznej. Istotne jest poznanie oddziaływań prowadzących do bardzo delikatnej równowagi sił konstruktywnych i destruktywnych, dzięki którym powstają struktury supramolekularne. Podjęcie się takiego zadania może tylko grupa badawcza posiadająca

bardzo duża wiedzę i znajomość oddziaływań atomowych i cząsteczkowych, potrafiąca poprawnie analizować rezultaty obliczeń oraz mająca duże doświadczenie w symulacji dynamiki molekularnej (MD). Doktorantka pracowała w takich renomowanych i znanych na świecie zespołach tak na Wydziale Lekarskim jak i na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego kierowanych przez prof. dr hab. I. Roterman-Konieczną i prof. dr. hab. J. Korchowca.

Rozdział pracy doktorskiej mgr Klaudii Kwiecińskiej dotyczący obliczeń kwantowo-mechanicznych agregatów i aglomeratów cząsteczek CR i DOX i symulacji MD stanowi jej najistotniejszą i najobszerniejszą część. W rozdziale 4.1. Metody badawcze Doktorantka starała się streścić wiedzę na temat mechaniki kwantowej by dać wprowadzenie do wykonanych obliczeń. Oczywiście jest to zadanie karkołomne bo nie da się nawet na 20 stronach maszynopisu streścić tego co w pięknej monografii L. Peli zawarte jest na 1304 stronach. Żeby zrozumieć to o czym pisze Doktorantka w tym rozdziale trzeba wieloletnich studiów. Ta część pracy wskazuje, że Doktorantka dobrze opanowała ten złożony obszar wiedzy i potrafi świadomie z niego korzystać.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej (4.4. Hodowle komórkowe) stanowi opis techniki hodowania kultur komórkowych służących do laboratoryjnego testowania transportu DOX do komórek nowotworowych. Opis jest zwięzły w związku z tym dziwi brak odniesień do danych literaturowych tak by czytelnik mógł zapoznać się szczegółowo z procedurą. Nie jest jasne jak były immobilizowane komórki, które później badano metodą rozproszenia ramanowskiego tworząc mapy rozproszeniowe komórek. Pisząc o pasmach ramanowskich komórki i CR przy wzbudzeniu długością fali 785 nm nie wspomina o najważniejszej cząsteczce – DOX (str. 41). Nie wyjaśnia też co jest źródłem fluorescencji rejestrowanej przy zastosowaniu wzbudzenia laserem o długością fali 532 nm.

Ważną częścią rozprawy są badania wpływu CR, DOX oraz aglomeratów CR/DOX na monowarstwę lipidową DPPC wytworzoną techniką Langmuira na granicy faz powietrze-woda oraz pomiary szybkości adsorpcji badanych układów poprzez pomiary zmian napięcia powierzchniowego monowarstwy Langmuira DPPC w funkcji czasu.

Rozdział 5. Wyniki i wnioski a w nim 5.1. Obliczenia kwantowo-chemiczne i 5.2. Dynamika molekularna zajmują największą część rozprawy. Doktorantka opisuje optymalizację izolowanych monomerycznych form CR i DOX oraz ich dimerów CR/CR i CR/DOX korzystając z bazy funkcjonałów gęstości B3LYP. Tabela 1 zawiera uzyskane wyniki energii oddziaływania z podziałem na ich składowe dla badanych dimerów. (Skrótowe oznaczenia energii powodują konieczność szukania ich znaczenie a poprzednich rozdziałach). Uzyskane wyniki nie dają jasnego wglądu w przyczyny istnienia stabilnych form zagregowanych cząsteczek. Z tego powodu wykonano obliczenia z uwzględnieniem oddziaływań z otoczeniem – rozpuszczalnikiem, którym jest woda. To zdecydowane urealnienie sytuacji prowadzi do wyników zasadniczo różnych od poprzednich. Dobrą prezentacją rezultatów są wartości zmian entalpii i energii swobodnej Gibbsa zebrane w tabelach 2 i 3. Wartości energii skazują na preferencyjne tworzenie się w wodzie agregatów

CR. Ten trend wykazują obliczenia z zastosowaniem dwóch różnych funkcjonałów (B3LYP i M062X). Kolejnym ważnym krokiem do zrozumienia oddziaływań w dimerach było zastosowanie kwantowej teorii atomów w cząsteczkach (QTAIM). Ta szczegółowa i zaawansowana analiza pozwoliła na przedstawienie oddziaływań pomiędzy poszczególnymi atomami w sąsiadujących cząsteczkach. Obliczenia i analiza oddziaływań stanowi istotną część eksperymentów *in silico* prezentowanych w dysertacji. Doktorantka nie analizuje czy dimery CR/CR mają tendencję do dołączania kolejnych cząsteczek CR tak, że tworzy się oligomer lub dłuższa struktura taśmowa. Szkoda, że rysunki 5 i 6 są tak małe, że nie widać szczegółów. Brakuje odnośników do prac własnych, w których jest to lepiej zaprezentowane. Osiągnięte wyniki mają duże znaczenie dla badaczy zajmujących się agregacją cząsteczek i tworzeniem się struktur supramolekularnych a nie będących specjalistami z zakresu chemii kwantowej.

Kolejną częścią rozprawy doktorskiej jest prezentacja wyników symulacji komputerowych dynamiki molekularnej badanych układów. Zastosowano pole siłowe CHARMM, w którym rozkład ładunków wynika z oddziaływań pomiędzy donorem i akceptorem wodoru w CR i DOX a cząsteczkami wody będącej w ich otoczeniu. Odtworzenie tych sił było kluczowe dla scharakteryzowania procesu samoorganizacji cząsteczek. Osiągnięte wyniki najlepiej prezentują rysunki 9 – 12 przedstawiające konfiguracje wyjściowe i końcowe cząsteczek CR/CR, CR/DOX. Doktorantka uwzględniła stałą liczbę atomów (powyżej 200 tys.) w pudełku symulacyjnym o rozmiarze 130 \AA^3 ale brakuje informacji ile cząsteczek CR lub/i DOX w nim umieściła. Okazuje się, że najczęściej powstają agregaty CR złożone z 5 cząsteczek (Rys. 10a) lub 5CR/8DOX (Rys. 10c). Rysunki 13 i 14 pokazują średnią liczbę cząsteczek w agregatach. Jest ich 5 dla CR i 7 dla CR/DOX. Trudno takie układy nazywać taśmami czy wstęgami. Symulacje dynamiki molekularnej pokazują, że powstające agregaty i aglomeraty są strukturami dynamicznymi z ciągłą wymianą cząsteczek. Ten rezultat wskazuje na bardzo delikatną równowagę sił tworzących agregaty a nie na istnienie sił wiążących cząsteczki na stałe.

Po uzyskaniu wiedzy o agregacji cząsteczek CR i DOX na podstawie obliczeń komputerowych Doktorantka zaplanowała eksperymenty pozwalające ocenić realny wpływ badanych cząsteczek na błonę komórkową. Monowarstwy Langmuira utworzone z fosfolipidów stanowią najprostszy model błony biologicznej, na którym można ilościowo prześledzić stabilność monowarstwy poddanej działaniu czynników zewnętrznych. Doświadczenia wykonano na monowarstwach Langmuira fosfolipidu DPPC sprężanych na wodzie z solami fizjologicznymi (bufor PBS) z określonym stężeniem CR, DOX lub CR/DOX. Zarejestrowane izotermy wskazują na oddziaływanie badanych cząsteczek powodujące zmniejszenie upakowania i ściśliwości monowarstw co świadczy o adsorpcji cząsteczek do monowarstwy i/lub wnikania w jej strukturę. Najistotniejszą częścią wykresów współczynnika ściśliwości (C_s^{-1}) (rysunki 24 – 26) jest obszar niskich ciśnień powierzchniowych gdzie widoczne są przejścia fazowe zachodzące w monowarstwie DPPC, których mechanizm cząsteczkowy można dobrze opisać. Zmiany C_s^{-1} dla dużych ciśnień są

trudne do interpretacji. Do oceny procesów adsorpcji bardzo pomocne są kinetyki zmian ciśnienia powierzchniowego sprężonej monowarstwy DPPC pod wpływem dodania do subfazy badanych cząsteczek. Wykres na Rys. 27 pokazuje największe zmiany ciśnienia dla aglomeratów CR/DOX co wskazuje na zdecydowany wpływ agregatów CR na adsorpcję aglomeratów CR/DOX. Jednakże należy zauważyć, że kinetyka adsorpcji samych cząsteczek (agregatów) CR też jest bardzo duża.

Na podstawie badań właściwości monowarstw Langmuira DPPC z CR i CR/DOX obecnych w subfazie nie można stwierdzić czy następuje adsorpcja do monowarstwy czy też cząsteczki ją penetrują i w jaki sposób się w niej orientują. Dla wglądu w zachodzące procesy molekularne Doktorantka przeprowadziła kolejne symulacje dynamiki molekularnej występujące w monowarstwach Langmuira. Celem było prześledzenie transportu cząsteczek CR i DOX przez monowarstwę. Zastosowano model symetrycznej odpowiednio sprężonej monowarstwy DPPC rozdzielonej wodą, w której umieszczano badane cząsteczki. Symulacje prowadzono z wykorzystaniem pola siłowego CHARMM. Ważnym wnioskiem z tych symulacji jest to, że najmniej energii wymaga transfer cząsteczek CR oraz że bardzo wcześnie pojawiają się kompleksy CR/DPPC (adsorpcja CR do głów dwóch cząsteczek DPPC) i stwierdzenie braku kompleksów DPPC z DOX. Wyniki symulacji są syntetycznie zobrazowane na rysunkach 30 i 31, które pokazują agregację cząsteczek CR i DOX w obszarze wody oraz ułożenia cząsteczek CR/CR i CR/DOX w obrębie monowarstwy DPPC. Szczegółowe rozkłady części radialnej profili gęstości cząstkowych $\rho(z)$ poszczególnych części cząsteczek zaprezentowano na rysunkach 32 i 33. Symulacje przeprowadzono „przy wybranym napięciu powierzchniowym $\gamma = 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ” a w eksperymentach z adsorpcją do monowarstw Langmuira DPPC ciśnienie powierzchniowe wynosiło $28 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Jaka jest relacja pomiędzy tymi warunkami?

Doktorantka przeprowadziła także doświadczenia z natywnymi komórkami nowotworowymi (MCF7 i T24) poddanyymi procedurze inkubacji CR i DOX. Analizę akumulacji badanych cząsteczek prowadziła za pomocą techniki rozpraszania nieelastycznego fotonów (spektroskopia Ramana). Ta część powinna zamykać rozprawę ponieważ stanowi logiczne zakończenie działań związanych z dostarczaniem leku do komórki. Zastosowane dwie długości fali światła laserowego 532 nm i 785 nm pozwoliły odpowiednio na rejestrację fluorescencji komórek oraz pasm ramanowskich. Doktorantka wykorzystwała widma fluorescencji do analizy efektywności wprowadzania leku do komórki. Dla obu linii komórkowych największe zmiany rejestrowano gdy komórki były inkubowane w roztworze CR/DOX. Najlepiej uwidacznia się to na mapach powstałych w wyniku skanowania przestrzennego komórki nowotworowej i rejestrowaniu natężenia fluorescencji dla przesunięcia ramanowskiego 2000 cm^{-1} . Mapy przedstawione na rysunkach 19 i 23 wskazują na efektywną kumulację DOX w obrębie jądra komórkowego przy traktowaniu komórek roztworem CR/DOX. Oznacza to, że stosowanie nośnika DOX w postaci agregatów CR pozwala na obniżenie stężenia DOX w trakcie terapii nowotworowej co przyczyni się do zmniejszenia skutków ubocznych terapii. W pracy nie ma typowej dla spektroskopii Ramana

analizy pasm odpowiedzialnych z drgania atomów powiązanych. Prawdopodobnie wynika to z problemów ze znalezieniem reprezentatywnych pasm wskazujących na wiązania atomów cząsteczek CR z DOX. Doktorantka nie pisze co jest źródłem fluorescencji. Stwierdza, że obserwuje fluorescencje komórki a z opisu map (Rys. 19 i 23) można się domyślać, że jest to fluorescencja DOX które znajduje się wewnątrz komórki.

Rozprawę kończą rozdziały 6 Dyskusja i 7 Podsumowanie. Wnioski, w którym Doktorantka zebrała syntetycznie najważniejsze dokonania poszerzające wiedzę na temat oddziaływań w agregatach CR/CR, CR/DOX jako potencjalny układ nośników dla transportu leków do komórek biologicznych.

Poza uwagami, które pojawiły się w trakcie omawiania rozprawy komentarza wymagają dwa poniższe problemy. Oba dotyczą powiązania wniosków wynikających z obliczeń komputerowych a zwłaszcza symulacji dynamiki molekularnej w powiązaniu z doświadczeniami z monowarstwami Langmuira. Symulacje dynamiki molekularnej prowadzone są dla kilkunastu molekuł CR lub/i DOX w pudełku symulacyjnym. Stężenie stosowane w eksperymentach jest zdecydowanie niższe. Na ile wyniki symulacji oddają sytuację w doświadczeniach? Podobne zagadnienie dotyczy bardzo obrazowo zaprezentowanej symulacji badanych molekuł w czystej wodzie a doświadczenia z monowarstwami Langmuira prowadzone były w buforze. Rola jonów w organizacji molekuł oraz procesów adsorpcji jest nie do przecenienia.

Całość rozprawy pani mgr Klaudii Kwiecińskiej należy ocenić bardzo wysoko nie tylko z powodu ilości i jakości wykonanych obliczeń komputerowych ale za powiązania ich z eksperymentami z monowarstwami Langmuira i liniami komórkowymi. Badania zostały logicznie zaplanowane i dobrze przemyślane. Materiał badawczy jest bardzo obszerny a liczba wykonanych eksperymentów bardzo duża. Szeroki zakres i różnorodność obliczeń komputerowych wymagała dużego zaangażowania a przede wszystkim zgłębienia i poznania oddziaływań pomiędzy molekułami i wielu złożonych technik obliczeniowych. Zastosowana przez Doktorantkę technika Langmuira wytwarzania monowarstw DPPC oraz analiza widm rozproszonych komórek rakowych poddanych działaniu CR i DOX poszerzyła wiedze w zakresie oddziaływań leków na natywne układy biologiczne. Wyniki pracy Doktorantki zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR) (3 publikacje o sumarycznym współczynniku wpływu $IF \cong 15,2$). Były również prezentowane na kilku konferencjach krajowych i zagranicznych.

W pracy jest dość dużo nieprecyzyjnych określeń i języka żargonu laboratoryjnego (np. „Z każdego punktu komórki zebrano 1 skan z zastosowaniem czasu integracji 0,5 s.” - str. 41) Podpisy pod rysunkami często są zbyt lapidarne co wymaga szukania szczegółów w tekście. Utrudnieniem jest też używanie przez Doktorantkę kilku różnych określeń na opisywany układ. Nawet na sąsiadujących stronach (np. str. 59) opisywany obiekt nazywany jest jako: układ, klaster, agregat, taśma, wstęga. Na stronie 61 najczęściej używana jest nazwa klaster.

Najbardziej mylące jest używanie określenie taśma czy wstęga dla agregatu składającego się z kilku cząsteczek.

Niedoskonałości w redakcji rozprawy doktorskiej nie mają wpływ na wysoką ocenę dokonań naukowych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Klaudii Kwiecińskiej stanowi znaczące osiągnięcie poszerzające wiedze o oddziaływaniach pomiędzy badanymi molekułami czerwieni kongo i doksorubicyny prowadzących do ich agregatów i aglomeratów oraz wyjaśniających adsorpcje i transport leku przez błonę biologiczną. Doktorantka udowodniła, że potrafi prowadzić badania naukowe na wysokim poziomie zwłaszcza w obszarze obliczeń kwantowo-mechanicznych i symulacji dynamiki molekularnej. W moim przekonaniu, przedłożona mi do oceny rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Klaudii Kwiecińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

