



Uniwersytet w Białymstoku
Instytut Biologii
Zakład Biofizyki
Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok, Polska

tel. (0-85) 745-73-49, fax (0-85) 745-73-02
e-mail: m.zamaraeva@uwb.edu.pl
<http://biol-chem.uwb.edu.pl/IP/POL/BIOLOGIA/zbz.htm>

Białystok, 20.03.2014

Prof. dr hab. Maria Zamarajewa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Łaźniewskiej pt. „Ocena toksyczności dendrymerów wiologenowo-fosforowych oraz fosforowych wobec mysich komórek nerwowych linii N2a i mHippoE-18”.

Rozprawa doktorska mgr **Joanny Łaźniewskiej** poświęcona jest analizie porównawczej toksyczności dwóch typów dendrymerów, nanostruktur, które w ostatnich latach są przedmiotem intensywnych badań w Katedrze Biofizyki Ogólnej, Uniwersytetu Łódzkiego - czołowej jednostce naukowej na skalę międzynarodową w tej tematyce.

Aktualność tematu pracy nie budzi wątpliwości. W ciągu ostatnich 30 lat dendrymery były intensywnie badane jako nanonośniki dla aktywnych biologicznie związków takich jak leki, kwasy nukleinowe, a także środki kontrastujące, radionuklidy i wiele innych. Same dendrymery również przejawiają szerokie spektrum aktywności biologicznej, w tym przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i antynowotworową. Jednak niezależnie od liczego i zróżnicowanego działania dendrymerów, główną przeszkodą w ich szerokim zastosowaniu jest niska rozpuszczalność i wysoka toksyczność tych związków.

Dla całego szeregu dendrymerów, w tym dla wybranych przez Doktorantkę kationowo-fosforowych i wiologenowo-fosforowych, charakterystyczna jest ich zdolność do hamowania fibrylacji i agregacji białek zaangażowanych w etiologię chorób neurodegeneracyjnych, co stwarza możliwości potencjalnego zastosowania dendrymerów w charakterze neuroprotektorów, pod warunkiem, że nie wykazują one działań toksycznych. Oprócz tego dendrymery wykazują aktywność przeciwnowotworową, co zakłada ich toksyczne działanie na komórki nowotworowe i w związku z tym wysoki potencjał zastosowania w charakterze leków antyrakowych.

W związku z powyższym Doktorantka za cel swojej pracy obrała zbadanie toksyczności wymienionych wyżej dendrymerów odnośnie dwóch linii mysich komórek nerwowych – nowotworowych (komórki nerwiaka płodowego - N2a) oraz prawidłowych, którymi były embrionalne komórki hipokampu - mHippoE-18.

Rozprawę doktorską stanowi zestawienie 3 oryginalnych prac eksperymentalnych i 1 pracy przeglądowej z imponującym całkowitym współczynnikiem IF, który wynosi 14,632 i liczbą punktów MNiSW wynoszącą 110. Trzeba podkreślić, że we wszystkich publikacjach pierwszym autorem jest Doktorantka, co świadczy o jej głównym wkładzie w napisanie tych prac (dodatkowo potwierdzonym oświadczeniami współautorów). Wszystkie publikacje, które służą za podstawę rozprawy doktorskiej mają charakter monotematyczny. W skład materiałów rozprawy wchodzi także 10 komunikatów zjazdowych, w tym dwa wystąpienia ustne.

Pierwszą pracą opublikowaną przez Doktorantkę w tematyce rozprawy była wielostronna publikacja przeglądowa pod tytułem „Dendrimers – revolutionary drugs for infectious diseases”, w której zacytowano 131 artykułów, co świadczy o doskonałej znajomości przez Autorkę współczesnego stanu badań w danej dziedzinie. Publikacja ta poświęcona zarówno strukturalnej różnorodności dendrymerów jak i ich właściwościom farmakologicznym niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę na temat biologicznej aktywności tych związków.

Wszystkie trzy prace eksperymentalne poświęcone są badaniu toksyczności dendrymerów odnośnie komórek neuronalnych. We wstępie do swoich publikacji Doktorantka bardzo dobrze uzasadniła konieczność i perspektywiczność swoich badań. Celem prac była nie tylko ocena toksyczności wybranych dendrymerów, ale także zbadanie mechanizmów tej aktywności względem komórek neuronalnych. Dla osiągnięcia postanowionego celu Doktorantka przeprowadziła kompleksowe badania z zastosowaniem szerokiego spektrum metod, co świadczy o znakomitej intuicji badawczej Mgr Joanny Łązniewskiej i Jej dobrym przygotowaniu do pracy eksperymentalnej. W swojej pracy Doktorantka zastosowała fotometryczne metody dla oznaczenia żywotności komórek (test cytotoksyczności MTT) oraz fluorymetryczne dla pomiarów potencjału mitochondrialnego, RFT, GSH, cyt c, aktywności oksydacyjnej mitochondriów, katalazy i kaspazy3. Z zastosowaniem cytometru przepływowego przeprowadzona została analiza morfologii komórek oraz cyklu komórkowego. Przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego oceniony został procent apoptotycznych i nekrotycznych komórek w populacji. Reasumując, uznać należy, że warsztat badawczy Doktorantki jest imponujący.

Ten szeroki zakres wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej pozwolił Autorce bardzo szczegółowo przeanalizować wpływ przedstawicieli dwóch typów dendrymerów na dwóch liniach komórkowych. Mianowicie w przypadku dendrymerów wiologenowo-fosforowych były to - VPD1 i VPD2, a w przypadku kationowo-fosforowych - CPD G2 i G3, różniące się między sobą masą molekularną i ładunkiem.

Analiza porównawcza przeprowadzona przez Doktorantkę wykazała, że wiologenowo-fosforowe dendrymery (VPDs) wykazują niską toksyczność w porównaniu z kationowymi dendrymerami fosforowymi (CPD G2 i G3) dla obu linii komórkowych. Ponadto stwierdzono, że VPDs posiadają zdolność do redukcji poziomu RFT, co jest skorelowane ze wzrostem aktywności enzymu katalazy na tle niezmiennego poziomu GSH. W odróżnieniu od powyżej wymienionych efektów VPDs, kationowe dendrymery fosforowe - CPD G2 i G3 działały odwrotnie i powodowały generowanie RFT, przy czym CPD G3 wykazywały efekt silniejszy. Produkcja RFT wywołana kationowymi dendrymerami fosforanowymi w danym przypadku korelowała z ich negatywnym wpływem na żywotność komórek neuronalnych określoną testem MTT. Przynajmniej dla prawidłowych komórek HippoE-18 taka korelacja była wykryta w całym zakresie stosowanych stężeń dla CPD G3, który wykazał się większą toksycznością niż CPD G2. Produkcji RFT towarzyszyło zwiększenie oksyda-

cyjnej aktywności mitochondriów i zmiana ich potencjału. Na podstawie tych wyników Doktorantka stawia hipotezę, że taka wysoka toksyczność kationowych dendrymerów fosforowych jest związana z produkcją RFT, które kierują komórki neuronalne na drogę śmierci nekrotycznej, co zostało potwierdzone eksperymentalnie z użyciem mikroskopu fazowo-kontrastowego i cytometrii przepływowej. Natomiast traktowanie komórek obu linii niskotoksycznymi wiologenowo-fosforowymi dendrymerami nie spowodowało znacznych zmian ich morfologii, ale doprowadziło do pojawienia się nieznacznej ilości komórek apoptotycznych i tylko w linii prawidłowych komórek HippoE-18. Porównanie toksyczności dwóch przedstawicieli tej grupy dendrymerów pozwoliło stwierdzić, że w przypadku prawidłowych komórek najbardziej aktywnym był związek z większą MM (VPD1) w porównaniu z VPD3, co potwierdza hipotezę Doktorantki o roli ilości wiologenowych jednostek i ładunku w potencjale cytotoksycznym badanych związków. Należy jednak podkreślić, że na komórkach nowotworowych różnica między toksycznością badanych wiologenowo-fosforowych dendrymerów była mniej widoczna.

Za szczególnie ważne wyniki przeprowadzonych w recenzowanej pracy badań uważam wykazanie istotnych różnic w toksyczności wiologenowo-fosforowych i kationowo-fosforowych dendrymerów. Na podstawie tych danych Doktorantka wnioskuje, że nisko toksyczne wiologenowo-fosforowe dendrymery mogą znaleźć zastosowanie w biomedycynie. Natomiast wysokotoksyczne kationowo-fosforowe dendrymery mają perspektywę zastosowania, jednak pod warunkiem modyfikacji ich właściwości w kierunku ekranowania ładunku powierzchniowego, który jest odpowiedzialny za ich toksyczność. Te wnioski przedstawione przez autorkę w streszczeniu w pełni odzwierciedlają dane prezentowane w publikacjach.

Analizując publikacje stanowiące rozprawę doktorską pojawia się jednak kilka pytań dyskusyjnych. W publikacji pod tytułem „Mechanism of cation phosphorous dendrimer toxicity against murine neural cell lines” rozważając własne i literaturowe dane Doktorantka stwierdza, że komórki nerwowe są bardziej wrażliwe na toksyczne działanie badanych dendrymerów. W związku z tym powstaje pytanie czym jest to uwarunkowane? W tej publikacji wiarygodnie udokumentowano, że CPD G3 jest bardziej toksyczny niż CPD G2. Dane te potwierdzają założenie Doktorantki, że wraz ze wzrostem generacji rośnie toksyczność dendrymerów. Jednak z tej pracy, nie byłam w stanie dowiedzieć się, czy istnieje specyfika toksycznego działania kationowo-fosforowych dendrymerów w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych? Zgodnie z danymi dla stężenia IC50 uzyskanego testem MTT, komórki prawidłowe były bardziej wrażliwe na dendrymery CPD G3 w porównaniu z komórkami nowotworowymi (1,35 vs. 1,74), natomiast dla CPD G2 sytuacja była odwrotna (2,33 vs. 1,88). Traktowanie obu typów komórek tymi dendrymerami powoduje wzrost RFT i jak Doktorantka uważa, jest to związane ze zwiększoną aktywnością oksydacyjną mitochondriów. Przy tym, jak pokazano w doświadczeniach, CPD G2 w niskich stężeniach powoduje hiperpolaryzację, a przy wyższych depolaryzację. Natomiast CPD G3 wywołuje tylko depolaryzację w całym zakresie stosowanych stężeń. Te zmiany zdaniem Autorki wywołują produkcję RFT. Zgadza się, że w obu przypadkach mogą być generowane RFT. Ale mam pytanie, co powoduje zmiany potencjału? Jaki jest molekularny mechanizm oddziaływania dendrymerów z mitochondriami, który prowadzi do przeciwnej odpowiedzi? Można przyjąć, że dodatnio naładowane dendrymery wnikają do mitochondriów, co prowadzi do zmniejszenia potencjału, ale jak wtedy wytłumaczyć hiperpolaryzację?

Badania wiologenowo-fosforowych dendrymerów wykazały, że w komórkach nowotworowych związki te hamują tworzenie RFT w całym zakresie stężeń (1-20 μ M), podczas gdy w prawi-

dłowych komórkach przy stężeniu 20 μM związku wykazują prooksydacyjne działanie. Obniżenie poziomu RFT pod wpływem badanych dendrymerów łączone było ze zwiększoną aktywnością katalazy. Doktorantka sugeruje, że wzrost aktywności enzymu może być wynikiem bezpośredniego działania dendrymerów. Uważam, że jest to mało prawdopodobne. Raczej wzrost aktywności katalazy jest wynikiem zmniejszenia stężenia reaktywnych form tlenu. Pozostaje natomiast otwarta kwestia, jaki mechanizm leży u podłoża obniżenia poziomu RFT. Doktorantka sugeruje, odwołując się do literatury, że ten efekt może być wynikiem bezpośredniego "zmiatania" RFT dendrymerami. Niestety Autorka sama takich eksperymentów nie przeprowadziła, chociaż można było zrobić takie badania w systemach modelowych, co uzupełniłoby wiedzę na temat właściwości badanych dendrymerów.

Podsumowując, z przekonaniem stwierdzam, że otrzymane przez Doktorantkę dane mają dużą wartość praktyczną i teoretyczną. Wyniki rozprawy doktorskiej zostały już opublikowane w renomowanych czasopismach, wnosząc wiele nowych informacji w dziedzinie badań dendrymerów. Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa pt. „Ocena toksyczności dendrymerów wiologenowo-fosforowych oraz fosforowych wobec mysich komórek nerwowych linii N2a i mHippoE-18” jest wartościowym opracowaniem, całkowicie spełniającym wymagania na stopień naukowy doktora nauk biologicznych i zasługuje na wyróżnienie.

Zwracam się więc do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr **Joanny Łaźniewskiej** do dalszych etapów przebiegu doktorskiego

Prof. dr hab. Maria Zamarajewa