



Poznań, 2021-12-22

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pana Łukasza Nuckowskiego

pt.: „**Opracowanie metod przygotowania próbek oligonukleotydów antysensownych z wykorzystaniem klasycznych i nowego typu adsorbentów**”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana Łukasza Nuckowskiego została wykonana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki na Wydziale Chemii, Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod kierunkiem Pani dr hab. Sylwii Studzińskiej, prof. UMK. Badania zawarte w niniejszej pracy powstały w większości w wyniku realizacji projektu badawczego SONATA BIS zatytułowanego „Zastosowanie nowego typu adsorbentów oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w badaniu in vitro metabolizmu oligonukleotydów antysensownych dla potrzeb terapii antysensownej” (tj. grantu NCN nr 2016/22/E/ST4/00478) kierowanego przez Panią Promotor.

Tematyka pracy badawczej ocenianej rozprawy doktorskiej jest bardzo istotnym zagadnieniem bioanalitycznym z uwagi na fakt, iż selektywna ekstrakcja małych ilości kwasów nukleinowych ze skomplikowanych matryc biologicznych zawierających wysokie stężenie białek jest kluczowym etapem poprzedzającym procesy takie jak PCR, klonowanie, sekwencjonowanie czy po prostu ich analiza chromatograficzna. Z drugiej strony, opracowywane są podejścia terapeutyczne w oparciu o oligonukleotydy antysensowne (ASO, ang. *Antisense Oligonucleotides*), krótkie interferujące RNA (siRNA) oraz system CRISP/Cas9. Wyzwaniem na etapie opracowywania leków na bazie oligonukleotydów terapeutycznych jest opracowanie szybkich, wysokowydajnych metod przygotowania próbek do badania ich farmakokinetyki w systemie LADME (tj. akronim od słów L – liberation (uwolnienie), A – absorption (wchłanianie), D – distribution (rozmieszczenie), M – metabolism (metabolizm), E – excretion lub elimination (wydalanie/usuwanie). Należy pamiętać, że proces izolacji z matryc biologicznych jest trudny w przypadku



oligonukleotydów, które są obecne w niewielkich ilościach w osoczu pełnym białek, soli, lipidów i szczątków komórkowych. Ponadto właściwości polarne i polianionowe oligonukleotydów utrudniają stosowanie standardowych metod przygotowania próbek do analiz chromatograficznych (zwłaszcza LC/MS). W tym kontekście podjęcie przez mgr Łukasza Nuckowskiego badań nad usprawnieniem czy też opracowaniem wydajnych i mniej czasochłonnych procedur izolacji oligonukleotydów oraz ich metabolitów z złożonych matryc biologicznych jest jak najbardziej uzasadnione.

#### *Ocena pracy*

Treść pracy odpowiada tematowi określone w tytule. Praca w postaci jednotomowego opracowania zawiera 154 ponumerowanych stron i zawiera dziesięć rozdziałów. Zbudowana jest następująco: zawiera wprowadzenie (str. 7), sprecyzowane cele i założenia pracy doktorskiej (str. 11-12), komentarz do przedstawionego problemu badawczego zawarty w 4 podrozdziałach, które odnoszą się do artykułów naukowych, stanowiących część praktyczną recenzowanej pracy doktorskiej (str. 13-36). Kopie omawianych artykułów wraz z materiałami dodatkowymi (ang. *supplementary materials*) zebrane są w następnym rozdziale (Rozdział 4, str. 37-130). Całość zamykają: podsumowanie i wnioski (Rozdział 5, str. 131-132), spis cytowanej literatury (Rozdział 6, str. 133-138), streszczenie po polsku i angielsku (Rozdziały 7 i 8) oraz spis dorobku naukowego (Rozdział 9, str. 141-146). W ostatnim rozdziale zebrane zostały oświadczenia współautorów (Rozdział 10, str. 147-154). Ponadto w pracy znajduje się także wykaz stosowanych skrótów (str. 6).

Z formalnego punktu, oceniana praca doktorska nie ma formy klasycznej rozprawy, lecz oparta jest na 6 publikacjach (oznaczonych symbolami D1-D6), do których komentarz znajduje się w rozdziale 3, zatytułowanym (według mnie dość niefortunnie) „Problem badawczy”. W skład omawianego przez Autora cyklu prac wchodzi jedna praca przeglądowa D1 (Journal of Chromatography B IF 2,813) oraz 5 oryginalnych artykułów (D2 - Bioanalysis IF 2,321; D3 - Journal of Chromatographic Science IF 1,280; D4 - Analyst IF 3,978; D5 - Talanta IF 5,339; D6 - Materials IF 3,057). We wszystkich sześciu pracach mgr Łukasz Nuckowski jest pierwszym autorem, a dodatkowo w ostatniej pracy jest też autorem



korrespondencyjnym. Oprócz tego, Doktorant jest współautorem 5 innych prac z listy filadelfijskiej, które nie wchodzą w skład omawianego cyklu.

W liczącym 4 strony wprowadzeniu Autor w sposób zwięzły przedstawia problematykę badawczą rozprawy, kładąc nacisk na wagę problemu jakim jest analiza ASO i ich metabolitów w próbkach biologicznych w kontekście ich zastosowań jako przyszłe leki terapeutyczne. W wprowadzeniu dowiadujemy się też jakie artykuły stanowią podstawę przedstawionej dysertacji, co więcej Autor sygnalizuje nam ich zawartość.

Pan Łukasz Nuckowski za cel postawił sobie opracowanie nowych metod przygotowania próbek zawierających ASO niemodyfikowane oraz modyfikowane w obrębie grupy fosforanowej (pierwsza generacja ASO) lub w pozycji 2' reszty cukrowej (druga generacja ASO). Założenia rozprawy doktorskiej zostały ujęte w 6 punktach obejmujących: (1) przegląd i analizę doniesień literaturowych dotyczących metod przygotowania próbek oligonukleotydów, (2) badanie wpływu różnych warunków ekstrakcji, w tym rodzaju adsorbentu, na wartości odzysku ASO dla różnych technik przygotowania próbek (ekstrakcji do fazy stałej, ekstrakcji do sorbentu w igle, dyspersyjnej mikroekstrakcji do fazy stałej (D- $\mu$ -SPE), magnetycznej dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej); (3) syntezę oraz charakterystykę (spektroskopową oraz mikroskopową) anionowymiennych i obojnaczych adsorbentów na bazie usieciowanych poli(cieczy jonowych), oraz nanocząstek magnetycznych pokrytych tymi polimerami; (4) badania adsorpcji i desorpcji ASO z wykorzystaniem otrzymanych adsorbentów w trybie wymiany jonowej oraz oddziaływań hydrofilowych; (5) zaproponowanie nowych procedur do ekstrakcji oligonukleotydów niemodyfikowanych oraz z różnymi typami modyfikacji chemicznej tj. tiofosforanowych (PS), z modyfikacją 2'-O-metylo (ME) i 2'-O-(2-metoksyetylo) (MOE) rybozy, oraz zablokowanych kwasów nukleinowych tzw. LNA; (6) zastosowanie opracowanych procedur do ekstrakcji ASO i ich syntetycznych metabolitów ze wzbogaconego osocza ludzkiego przed ich analizą z wykorzystaniem ultra wysokosprawnej chromatografii ciekowej (UHPLC) w trybie par jonowych i w odwróconym układzie faz.



Część literaturowa, wprowadzająca Czytelnika w tematykę przygotowania próbek biologicznych zawierających oligonukleotydy do ich analizy chromatograficznej jest zwięzła, lecz nie pozbawiona krytycznego spojrzenia na stosowane metody separacyjne stosowane do usunięcia związków interferujących (głównie białek). Autor wspomina tutaj o nowatorskim podejściu do ekstrakcji ASO w układzie ciecz-ciecz (LLE) z użyciem klasycznych lub magnetycznych cieczy jonowych. Ten fragment uważam za zbyt lakoniczny w kontekście późniejszych badań podjętych przez Doktoranta nad nowymi adsorbentami do ekstrakcji ASO na bazie PIL czyli poli(cieczy jonowych) (prace D5 i D6).

W dalszej części rozdziału 3, mgr Nuckowski skupia się na przedstawieniu wyników badań własnych, które dotyczą doboru warunków ekstrakcji oligonukleotydów do fazy stałej (SPE) czy też mikroekstrakcji do sorbentu w igle (MEPS) oraz syntezy i zastosowania nowych adsorbentów w ekstrakcji oligonukleotydów. W pierwszym etapie badań przeprowadzony został rozdział mieszaniny oligonukleotydów i ich metabolitów na kolumnkach Oasis HLB® (z wypełnieniem polimerowym) lub InerSep C18 (wypełnionych krzemionką modyfikowana grupami oktadecylowymi) w trybie par jonowych (IPR) z użyciem mieszaniny heksafluoroizopropanolu (HFIP) oraz trzech różnych strukturalnie amin. Zaobserwowano przeciwstawny wpływ stężenia poszczególnych amin na wartości odzysku, co Autor tłumaczy różnicami w mechanizmie oddziaływań między grupami na powierzchni adsorbentu, IPR a ASO. Jednoznacznie wykazano, że adsorbent na bazie polimeru i wysoka zawartość metanolu to czynniki sprzyjające wysokiemu odzyskowi w porównaniu z adsorbentem C18. Kontynuując prace nad ekstrakcją ASO z próbek biologicznych, Autor zastosował też kolumnki z adsorbentem polarnym (niezmodyfikowany żel krzemionkowy) w trybie oddziaływań hydrofilowych (HI). Warto podkreślić, że po raz pierwszy opracowano procedurę ekstrakcji oligonukleotydów pierwszej i drugiej generacji w trybie HI. Zaproponowana procedura z zastosowaniem acetonu jako rozpuszczalnika organicznego cechowała się wysoką wartością odzysku (powyżej 90%), która niestety nie była już osiągalna w przypadku ekstrakcji ASO z wzbogaconego osocza ludzkiego. Należy



jednak pamiętać, że zaletą tej metody jest dobra powtarzalność i wykorzystanie rozpuszczalników bez dodatków soli czy IPR.

Dalsza część rozprawy związana jest z zastosowaniem mikroekstrakcji do fazy stałej jako techniki przygotowania próbek ASO do analizy chromatograficznej. Doktorant wybrał do tego celu komercyjnie dostępne igły z wypełnieniami o charakterze niepolarnym i próbował zaadoptować procedury ekstrakcji opracowane uprzednio przez siebie. Jednakże ze względu na fakt, iż w technice mikroekstrakcji do sorbentu w igle (MEPS) istotne jest dokładne kontrolowanie i odtwarzanie procesów sorpcji i desorpcji analitu z wypełnienia, konieczna okazała się optymalizacja warunków kondycjonowania. Ponadto, dla uzyskania najwyższych możliwych wartości odzysku istotne okazało się też określenie ilości cykli przepłukiwania adsorbentu próbką. Opracowana procedura MEPS z wykorzystaniem modyfikowanej krzemionki C18 została z powodzeniem zastosowana do ekstrakcji modyfikowanych oligonukleotydów PS i MOE oraz ich dwóch syntetycznych metabolitów z próbek osocza (odzyski około 70-80 %).

Kolejne badania Doktoranta, związane były z syntezą i zastosowaniem polimeryzowalnej cieczy jonowej (PIL) do ekstrakcji oligonukleotydów z próbek biologicznych. Część syntetyczna była wykonana we współpracy z mgr Krzysztofem Dzieszkowskim oraz prof. UMK dr hab. Zbigniewem Rafińskim z Katedry Chemii Organicznej UMK. W pierwszym podejściu (publikacja oznaczona D5) otrzymano 3 sypkie adsorbenty PIL, w wyniku polimeryzacji otrzymanych monomerów funkcyjnych na bazie alkilopochodnych imidazolu. W następnej pracy (oznaczonej D6), nanocząstki magnetyczne zostały pokryte 3 różnymi PIL o charakterze obojnaczym (zwitterjonowym) - MNP-Ac, MNP-Sul, and MNP-Mal. W obu przypadkach adsorpcja ASO na powierzchni otrzymanych adsorbentów zachodziła z roztworów octanu amonu o niskim pH (poniżej 4,5 jednostki pH). Wiadomo, że przy pH 5,0 i niższym oligonukleotydy są podatne na depurynację – proszę o komentarz w tej sprawie. Przetestowano wpływ soli (NaCl, NaNO<sub>3</sub>, NaClO<sub>4</sub>), ich stężenia oraz pH buforu i procentowego dodatku rozpuszczalnika organicznego (metanolu) na odzysk analitu. Wykazano, że desorpcja z powierzchni adsorbentów AD1 oraz AD2 tj. adsorbentów



z łańcuchami alkilowymi wymaga zastosowania wysokiej zawartości soli ze względu na ich silnie anionowymienny charakter. Ekstrakcja oligonukleotydów z użyciem technik mikrodyspersyjnych i adsorbentów na bazie PIL nie wymaga uprzedniego usuwania białek, co znacznie skraca procedurę przygotowania próbki do dalszych analiz. Użyteczność zaproponowanego materiału MNP-Ac w magnetycznej dyspersyjnej ekstrakcji została przetestowana dla 9 oligonukleotydów różniących się długością i typem modyfikacji chemicznej. Wartości odzysku przekraczały 80% z wyjątkiem ASO zawierających modyfikacje typu MOE oraz LNA. Przyznam, że spodziewałam się raczej, iż najniższy odzysk będzie uzyskany dla mikroRNA, z uwagi na alkaliczne warunki wymywania (pH 9,5) - RNA jest bowiem podatne na hydrolizę alkaliczną przy  $\text{pH} > 6$ . Czy stosowana metoda szacowania odzysku może w tym przypadku dawać zafałszowany wynik?

Jeżeli za oddziaływanie oligonukleotydów z PIL odpowiedzialne są nie tylko siły elektrostatycznego przyciągania między ujemnie naładowanym łańcuchem fosforo-cukrowym ASO i dodatnio naładowanym pierścieniem imidazoliowym ale także oddziaływania  $\pi$  między pierścieniami imidazolowymi i benzenowymi kopolimeru a heterocyklicznymi pierścieniami nukleozasad; to czy epigentyczne modyfikacje związane z metylacją mogłyby mieć istotny wpływ na sorpcję takich oligonukleotydów na omawianym adsorbencie? Tutaj nasuwa się też pytanie czy dobierając odpowiedni czynnik sieciujący i skład PIL można by uzyskać adsorbenty pozwalające na wydzielenie z materiału biologicznego oligonukleotydów o określonych strukturach drugorzędowych?

Podsumowując, podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał aplikacyjny. Projekt rozprawy jest przemyślany, cele jasno określone i osiągnięte przy dużym nakładzie pracy. Wnioski są poparte danymi eksperymentalnymi i odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły oraz usystematyzowały wiedzę na temat czynników wpływających na proces przygotowania próbek oligonukleotydów z użyciem dwuetapowej procedury ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) i ekstrakcji do fazy stałej (SPE) w trybie IPR lub HI. Ponadto mogą stanowić punkt wyjścia do podejmowania kolejnych prac badawczych nad rozwinięciem metod przygotowania



próbek ASO lub podobnych z wykorzystaniem technik tj. MEPS (mikroekstrakcji do sorbentu w igle) oraz dyspersyjnej mikroekstrakcji (D- $\mu$ -SPE) czy też magnetycznej dyspersyjnej ekstrakcji (MDSPE) do fazy stałej na bazie usieciowanych PIL.

Na podkreślenie zasługuje duża aktywność naukowa mgr Łukasza Nuckowskiego, który jest współautorem 11 publikacji w czasopismach z bazy JCR oraz 1 monografii i 4 publikacji polskojęzycznych w czasopismach spoza JCR. Ponadto wyniki swoich prac prezentował na konferencjach krajowych i międzynarodowych w formie 1 wykładu, 9 plakatów, 4 wystąpień ustnych oraz jest współautorem 6 wykładów i komunikatów oraz 7 posterów. Jak wspomniano na początku, mgr Nuckowski brał udział w realizacji grantu NCN SONATA BIS, ponadto uzyskał kilkakrotnie finansowanie swoich badań na poziomie Uczelni (m.in. w ramach konkursu „Inicjatywa doskonałości – Grants4NCUStudents”).

Na koniec należy też stwierdzić, że praca jest napisana starannie i właściwie nie napotyka się na błędy edytorskie lub stylistyczne. Przedstawiono w niej wartościowe wyniki, które będą niewątpliwie pomocne w dalszym rozwijaniu technik i opracowywaniu procedur przygotowania próbek oligonukleotydów ze skomplikowanych matryc biologicznych.

*Wniosek końcowy*

W mojej opinii praca doktorska Pana Łukasza Nuckowskiego pt.: „Opracowanie metod przygotowania próbek oligonukleotydów antysensowych z wykorzystaniem klasycznych i nowego typu adsorbentów” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wobec tego wnioskuję do Rady Dyscypliny na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Łukasza Nuckowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, a także bogaty dorobek naukowy mgr Łukasza Nuckowskiego, zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Dembska, prof. UAM