



Dr hab. Hanna Pruchnik, prof. UPWr

Wrocław, 20.12.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Szwed pt.
„Ocena właściwości biologicznych dendrymerów hybrydowych
karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych (SMT)”**

Badania wykonane przez mgr Aleksandrę Szwed dotyczą aktualnych i ważnych zagadnień związanych z możliwościami wykorzystania nowej grupy dendrymerów hybrydowych w medycynie. Dendrymery dzięki swojej specyficznej strukturze oraz określonym właściwościom chemicznym i fizycznym idealnie nadają się do transportu leków czy też materiału genetycznego. Ta sama makromolekuła może być nośnikiem zarówno enkapsulowanych jak i powierzchniowo przyłączonych związków. Niezwykle istotne jest również to, że stosunkowo łatwo można zmodyfikować właściwości danej nanocząsteczki i precyzyjnie zaprojektować strukturę, tak aby zwiększyć jej biodystrybucję i zgodność biologiczną. Ważne jest również to, że większość dendrymerów charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, co niewątpliwie zwiększa ich biodostępność. Nanocząstki, aby mogły znaleźć praktyczne zastosowanie w medycynie powinny być nietoksyczne, nieimmunogenne, biodegradowalne, posiadać zdolność wnikania do komórek oraz docierać do konkretnych celów biologicznych. Stąd, w oparciu o wyniki licznych doświadczeń, syntezowane są nowe, bądź modyfikowane już istniejące dendrymery o potencjalnym zastosowaniu farmaceutycznym jako nośniki dla leków, materiału genetycznego czy też jako leki same w sobie. Oczywiście, oprócz określenia struktury i właściwości fizykochemicznych nanocząsteczek, niezwykle istotne jest przeprowadzenie odpowiednich testów biologicznych, które pozwolą na wybór makromolekuł o optymalnych właściwościach.

Pani mgr Aleksandra Szwed w ramach swojej rozprawy doktorskiej podjęła się takiego zadania, wykonała badania mające na celu sprawdzenie właściwości biologicznych nowo otrzymanych dendrymerów hybrydowych karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych (SMT) pierwszej (SMT1) i drugiej generacji (SMT2).



Praca ta została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Gabryelak w Katedrze Biofizyki Ogólnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania opisane w dysertacji były przeprowadzone w ramach kilku projektów, m.in. „Mechanizmy oddziaływań pomiędzy dendrymerami a białkami” (HARMONIA, NCN, UMO2012/04/M/NZ1/00059), „Sieć UE-Białoruś-Rosja w dziedzinie przeciwnowotworowej terapii genowej z wykorzystaniem nanomateriałów” (program FP7-PEOPLE-2012-IRSES).

Rozprawa doktorska została zredagowana w formie manuskryptu (157 stron) z licznymi schematami, wykresami oraz tabelami (50 rycin, 8 tabel) i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Dysertacja została podzielona na 13 rozdziałów, zawiera krótki wstęp, obszerne wprowadzenie literaturowe, wyodrębniony cel badań, hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję i wnioski, streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo (175 pozycji) oraz dorobek naukowy Autorki. Układ pracy jest przejrzysty i czytelny, szczegółowy spis treści pozwala szybko odnaleźć odpowiednie fragmenty tekstu, wykaz stosowanych skrótów jest bardzo obszerny i ułatwia czytanie rozprawy.

Pierwsza, teoretyczna część rozprawy, została napisana w formie przeglądowej pracy naukowej i składa się z czterech rozdziałów. Na podstawie literatury, z czego około 26% są to pozycje z ostatnich lat (2014-2019), Doktorantka bardzo dobrze wprowadza czytelnika w obszar badań związany z dendrymerami. Warto podkreślić, że wstęp teoretyczny świadczy o dużej znajomości tematu i umiejętnościach Doktorantki w zakresie krytycznej analizy danych literaturowych. Autorka opisuje ogólne właściwości dendrymerów, krótko przedstawia ich poszczególne rodzaje i omawia przykłady zastosowania tego typu nanocząstek w medycynie. Następnie wyjaśnia zasadność badań oddziaływań dendrymerów z białkami, podaje ich przykłady jako transporterów leków i materiału genetycznego oraz syntetycznie opisuje toksyczność wybranych dendrymerów testowanych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Po wstępie literaturowym Autorka uzasadnia cel pracy oraz formułuje trzy hipotezy badawcze. Ogólnym celem pracy jest ocena aktywności biologicznej dwóch generacji nowej klasy dendrymerów hybrydowych (SMT1, SMT2) pod kątem ich potencjalnego zastosowania, np. w terapii przeciwnowotworowej lub w zaburzeniach neurodegeneracyjnych. Jasno sformułowane, szczegółowe cele pracy odpowiadają tematycznie postawionym hipotezom i



dotyczą: określenia oddziaływania SMT1 i SMT2 z wybranymi białkami enzymatycznymi, oceny wpływu SMT na mysie linie komórek nerwowych oraz wykazania, czy nowe hybrydowe dendrymery mogą być potencjalnymi nośnikami siRNA.

Opis wyników poprzedza rozdział „Materiały i metody badawcze”, który został poprawnie opracowany na 19 stronach. Podane są źródła pochodzenia testowanych związków i odczynników oraz syntetycznie opisana metodyka. Warte podkreślenia jest to, że Doktorantka zastosowała szereg różnych metod badawczych, m.in. pomiar potencjału zeta, elektroforezę żelową, spektropolarymetrię dichroizmu kołowego, cytometrię przepływową, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM).

Kolejne dwa rozdziały „Wyniki” i „Dyskusja” stanowią około 50% pracy. Wyniki zostały omówione systematycznie i w miarę szczegółowo, przedstawiono je w postaci wykresów lub tabel oraz dołączono odpowiednie zdjęcia mikroskopowe. Badania, zgodnie z założonym celem, przeprowadzono w trzech etapach.

W etapie pierwszym sprawdzono czy hybrydowe dendrymery mogą tworzyć kompleksy z fosfatazą alkaliczną, dehydrogenazą L-mleczanową oraz aminotransferazą asparaginianową. Doktorantka w pełni uzasadniła wybór tego typu białek do swoich badań. Na tym etapie pracy nie tylko przeanalizowała tworzenie kompleksów pomiędzy wybranymi białkami a SMT, ale także określiła wpływ dendrymerów na strukturę drugorzędową białek oraz ich konformację.

Celem drugiego etapu badań było sprawdzenie czy SMT1 i SMT2 mogą być potencjalnymi nośnikami lub lekami w zaburzeniach ośrodkowego układu nerwowego. Do testów wybrane zostały dwie linie komórkowe, powszechnie uznane za reprezentatywne w badaniach schorzeń układu nerwowego, komórki nerwiaka płodowego (N2a) oraz embrionalne komórki hipokampalne (mHippoE-18). Należy podkreślić, że oprócz testów MTT i Alamar Blue przeprowadzono analizę zmian poziomu reaktywnych form tlenu (sonda H₂DCFDA), potencjału błony mitochondrialnej (sonda JC-1), oceniono zmiany morfologiczne oraz ultrastrukturalne komórek (barwienie DAPI i folidyna Texas Red-X, TEM), a także wielkości frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych (podwójne barwienie Ann-V/PI i OA/EB).

W trzecim etapie pracy, podobnie jak w poprzednich, wykorzystano szereg komplementarnych metod (pomiar potencjału zeta, dichroizm kołowy, elektroforeza żelowa, TEM) w celu



sprawdzenia czy dendrymery SMT mogą być potencjalnymi nośnikami dla siRNA. Co jest warte podkreślenia, oprócz dokładnej analizy kompleksów SMT/siRNA, sprawdzono cytotoksyczność dendrymerów i dendrypleksów względem ludzkiej linii komórek ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) i wobec prawidłowych, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Dodatkowo, oceniono stopień internalizacji dendrypleksów w komórkach HL-60 z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej i mikroskopu konfokalnego, określono również wielkość frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach linii HL-60 z SMT1 i SMT2 oraz dendrypleksami SMT/siRNA.

Wyniki badań zostały przedyskutowane na 24 stronach, świadcząc o dużej znajomości zagadnień, których dotyczy rozprawa doktorska. Dyskusja została przeprowadzona bardzo rzetelnie z zachowaniem chronologii wykonanych badań. Mgr Aleksandra Szwed nie tylko szczegółowo przeanalizowała otrzymane rezultaty, ale co jest bardzo istotne, porównała je z wynikami uzyskanymi wcześniej oraz z doniesieniami innych autorów zajmujących się podobną tematyką cytując adekwatne i aktualne publikacje.

W rozdziale „Wnioski” Autorka ustosunkowała się do postawionych w pracy hipotez badawczych i sformułowała wniosek końcowy. Stwierdza w nim, że dendrymery generacji pierwszej SMT1 mają korzystniejsze właściwości biologiczne i w związku z tym prawdopodobieństwo zastosowania ich w medycynie jest większe w porównaniu z dendrymerami generacji drugiej SMT2. W pełni zgadzam się z Doktorantką, że uzyskane wyniki stanowią solidną bazę informacji oraz są podstawą do dalszych badań nad cytotoksycznością dendrymerów hybrydowych, szczególnie SMT1, wobec komórek nowotworowych, a także do dalszych testów nad transportem materiału genetycznego.

Praca doktorska została starannie zredagowana, jednakże Autorka nie uniknęła kilku drobnych błędów, o których z obowiązku recenzenta wspominam, np.: podrozdział 3.2. (str.26), „w 1989 rok”; podrozdział 3.2. (str.30), niepotrzebny średnik w cytowaniu literatury (wiersz 3); podrozdział 8.2. (str.73), „układy nerwowego”; podrozdział 8.3.8 (str. 108), w podpisie błędnie został podany numer ryciny, ponadto w tekście pracy nie ma odniesienia do załączonego rysunku. Zaznaczam, że ww. pomyłki redakcyjne nie zmniejszają wartości rozprawy, którą czyta



się z bardzo dużym zainteresowaniem. Wyrażam przekonanie, że cel badań postawionych w pracy został w pełni zrealizowany. Po ciekawej lekturze mam kilka pytań:

- 1) Czy znana jest struktura rentgenograficzna dendrymerów SMT1 i SMT2? Jak duże są to cząsteczki?
- 2) Autorka napisała, że przed wykonaniem pomiarów potwierdzono, że dendrymery SMT nie są wzbudzone stosowaną w pomiarach długością fali i nie emitują fluorescencji. Czy dendrymery SMT posiadają właściwość emisji fluorescencji? Jeśli tak, to jaka długość fali wzbudzenia powoduje emisję fluorescencji przez SMT?
- 3) Do wzbudzenia DAPI stosowano laser emitujący światło o długości fali 405 nm. Laser o długości fali wzbudzenia 405 nm skutkuje niskim poziomem fluorescencji tego znacznika. Czy nie warto byłoby w kolejnych badaniach zastosować inną długość fali wzbudzenia dla DAPI albo zmienić znacznik?
- 4) Doktorantka stwierdziła, że dendrymery SMT „mogą oddziaływać z błonami plazmatycznymi”, czy planowane są eksperymenty, które wyjaśniłyby jak badane dendrymery wpływają na właściwości błon biologicznych?
- 5) Jakie dodatkowe eksperymenty Doktorantka planuje wykonać „aby szczegółowo określić mechanizm internalizacji dendrymerów do komórki”?

Podsumowując, praca doktorska Pani mgr Aleksandry Szwed zawiera elementy nowości naukowej i stanowi oryginalny wkład do wiedzy w zakresie badań nad aktywnością biologiczną dendrymerów, szczególnie karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych. Należy zaznaczyć, że zostało wykonanych wiele eksperymentów przy użyciu komplementarnych metod, co świadczy o dużym zaangażowaniu i pracowitości Doktorantki, a także o tym, iż opanowała Ona dobrze nowoczesny warsztat badawczy i posiada umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej (zaplanowanie i wykonanie eksperymentów, opracowanie i interpretacja wyników). Warto też podkreślić bardzo dobry dorobek naukowy mgr Aleksandry Szwed, która jest współautorką ośmiu publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania 25,303 (MNiSW 270 pkt.). Wyniki swoich badań, w formie wystąpień ustnych, prezentowała na czterech, a w formie plakatów – na dwunastu konferencjach krajowych i międzynarodowych. Na podkreślenie



zasługuje fakt, że Doktorantka prowadziła badania we współpracy nie tylko z innymi jednostkami na Uczelni (Pracownia Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych UŁ), ale także z kilkoma ośrodkami zagranicznymi: Uniwersytet Alcalá w Hiszpanii (Katedra Chemii Organicznej i Chemii Nieorganicznej), Białoruska Akademia Nauk w Mińsku (Instytut Biofizyki i Inżynierii Komórki), Syberyjski Oddział Rosyjskiej Akademii Nauk w Rosji (Instytut Biologii Chemicznej i Medycyny Podstawowej). Pani mgr Aleksandra Szwed wyjeżdżała na staże naukowe do niektórych z tych ośrodków: Białoruska Akademia Nauk w Mińsku, Rosyjska Akademia Nauk w Nowosybirsku oraz Uniwersytet Komeńskiego w Bratysławie, co niewątpliwie pozwoliło na zdobycie doświadczenia i poszerzenie swojej wiedzy na temat różnych metod badawczych.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgr Aleksandry Szwed jest bardzo wartościowa, wyniki w niej zawarte wnoszą istotny wkład w rozwój badań nad możliwością wykorzystania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych w medycynie. Wiedza na temat biologicznych właściwości dendrymerów ma ogromne znaczenie w kontekście poszukiwania skutecznych, nietoksycznych środków przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych oraz przeciwapłytykowych.

Stwierdzam, że przedłożona przez mgr Aleksandrę Szwed rozprawa odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami. Zwracam się uprzejmie do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Szwed do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Hanna Pruchnik