

Prof. dr hab. n. med. Zofia Pawłowska
Kierownik Centralnego Laboratorium Naukowego

Łódź, 14 sierpnia 2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Michlewskiej pt.:
„Przeciwnowotworowe właściwości dendrymerów zawierających ruten”
wykonanej w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi
pod kierunkiem dr hab. Maksima Ionova, prof. nadzw. UŁ

Na pracę doktorską Pani mgr Sylwii Michlewskiej składają się trzy spójne tematycznie publikacje, które ukazały się w międzynarodowych czasopismach naukowych w latach 2017-2019. Łączny współczynnik oddziaływania IF (*impact factor*) tych trzech publikacji wynosi 10,802, a liczba punktów MNiSW 110. Wszystkie one są współautorskimi pracami eksperymentalnymi: *Journal of Inorganic Biochemistry* 2018 (IF 3,348), *European Polymer Journal* 2017 (IF 3,485) i *Future Medicinal Chemistry* 2019 (IF 3,969), których wyniki zostały już poddane wnikliwej ocenie niezależnych recenzentów, wyznaczonych przez redakcje czasopism i wydawców. We wszystkich tych artykułach Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej znaczący wkład w ich realizację i powstanie został potwierdzony załączonymi oświadczeniami współautorów (15). Oszacowany jest on w kolejnych pracach na 82%, 62% i 60%. W każdej z tych prac Doktorantka wykonywała badania, interpretowała uzyskane wyniki oraz przygotowywała manuskrypty do publikacji.

Rozprawa doktorska zawiera na wstępie informację o źródłach finansowania badań oraz część tekstową, która jest krótkim opracowaniem publikacji. Zawiera ona następujące rozdziały: 1. Przedstawienie hipotezy badawczej i omówienie wyników pracy obejmujące - wprowadzenie, cele, metodykę badań, omówienie wyników i wnioski; 2. Streszczenie w języku polskim; 3. Streszczenie w języku angielskim; 4. Literatura (25 pozycji z lat 2012-2019). Rozdział 5 zawiera Dorobek naukowy, a rozdział 6. Działalność naukową Doktorantki. Do rozprawy dołączone są kopie cyklu trzech artykułów (umieszczone niestety w innej niż w spisie kolejności). Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada w pełni jej zawartości i obejmuje swoim zasięgiem wszystkie publikacje dołączone do pracy.

Rozprawa doktorska mgr Sylwii Michlewskiej dotyczy bardzo interesujących i aktualnych zagadnień związanych z możliwościami wykorzystania związków polimerowych o szczególnych właściwościach, tzw. dendrymerów, do celów terapeutycznych. Wpisuje się ona ściśle w nurt badań realizowanych w ostatnich latach bardzo szeroko w Katedrze Biofizyki Ogólnej UŁ. Badania nad zastosowaniem tych nanocząstek w medycynie dzieli się na dwa kierunki. W jednym z nich prowadzi się badania nad właściwościami leczniczymi samych dendrymerów, a w drugim wykorzystuje się te związki jako nośniki dla innych substancji leczniczych. Wykorzystanie nanotechnologii jako systemu dostarczania leków jest jednym z najnowszych i najbardziej obiecujących kierunków badań, szczególnie w onkologii.

Praca doktorska obejmuje badania karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten (CRD) jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych oraz jako nośników cząsteczek krótkiego interferującego RNA (siRNA). Związki rutenu, znane już ze swojej przeciwnowotworowej aktywności, są intensywnie badane w kierunku możliwości ich wykorzystania w terapii. Niektóre kompleksy rutenu znajdują się już w różnych fazach badań klinicznych.

Cząsteczki siRNA wzbudzają duże zainteresowanie wśród badaczy zajmujących się terapią przeciwnowotworową z wykorzystaniem osiągnięć biologii molekularnej. Odkrycie możliwości regulacji ekspresji genów przy użyciu egzogennej RNA stało się obiecującym narzędziem w biologii i medycynie. Nadzieje budzi możliwość ich selektywnego działania na komórki nowotworowe i wyciszania wybranych genów, w tym onkogenów. Prowadzone są już badania kliniczne z zastosowaniem siRNA w terapii wielu chorób, m.in. wirusowych oraz nowotworowych. Połączenie mechanizmu interferencji RNA z lekami cytostatycznymi i/lub radioterapią może odgrywać coraz istotniejszą rolę w znaczącej poprawie skuteczności dotychczas stosowanych terapii. Ze względu na niestabilność siRNA w warunkach *in vivo* (podatny na degradację przez wszechobecne rybonukleazy) oraz trudności z efektywnym wnikaniem tych cząsteczek do komórki docelowej, dużym wyzwaniem jest poszukiwanie metod dostarczenia ich do wnętrza komórki w formie niezdegradowanej przez nukleazy. Jedną z dróg takiego działania jest zastosowane w tej pracy doktorskiej kompleksowanie siRNA ze specjalnymi nośnikami, którymi są dendrymery o wyjątkowych cechach strukturalnych, a zatem badania nad wykorzystaniem dendrymerów zawierających ruten jako nośników kwasów nukleinowych jest bardzo aktualnym i interesującym kierunkiem badań. Wybór tematu badawczego rozprawy należy uznać za bardzo trafny, mogący się przyczynić do poznania zakresu aktywności biologicznej tych nanocząstek oraz określenia mechanizmu ich działania.

Celem badań przedstawionych w pracy była ocena aktywności przeciwnowotworowej dendrymerów CRD, a także analiza możliwości wykorzystania ich jako nośników przeciwnowotworowych siRNA. Hipoteza badawcza zakładająca zwiększenie przeciwnowotworowych właściwości dendrymerów poprzez dołączenie do ich struktury rutenu sprawdzana była poprzez realizację pięciu celów szczegółowych obejmujących: - charakterystykę właściwości biofizycznych dendrymerów zawierających ruten; - ocenę ich cytotoksyczności; - zbadanie możliwości ich wykorzystania jako nośników siRNA; - wyjaśnienie mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej wybranych dendrymerów; oraz – wybór najbardziej obiecujących dendrymerów do zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

Pierwsza z cyklu publikacji (kolejność wg zamieszczonego Spisu): „Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA” (*J Inorg Biochem.* 2018) dotyczy charakterystyki oddziaływania wybranych dendrymerów zawierających ruten z przeciwnowotworowymi siRNA. Do badania tych oddziaływań oraz właściwości tworzonych kompleksów zastosowano wiele nowoczesnych technik badawczych, m.in. transmisyjną mikroskopię elektronową, dichroizm kołowy, polaryzację fluorescencji, pomiar potencjału zeta i in. Możliwości internalizacji tych kompleksów przez komórki badano wykorzystując linię komórkową białaczki HL-60, stosując metody cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej. Takie szerokie podejście eksperymentalne jest wielką zaletą tej publikacji. Wyniki tej pracy wskazują, że dendrymery zawierające ruten mogą tworzyć kompleksy z siRNA, które mają potencjał do wnikania do wnętrza komórek nowotworowych. Autorka wykazała, że spośród sześciu badanych związków, trzy dendrymery CRD13, 14 i 28 mogą ponadto pełnić funkcję ochronną dla przenoszonych siRNA przed degradacją ich przez nukleazy, co zwiększa możliwości użycia ich w terapii chorób nowotworowych. Badanie wpływu dendrymerów na strukturę cząsteczek siRNA z zastosowaniem

dichroizmu kołowego wykazało, że ich obecność znacząco zmienia strukturę drugorzędową kwasów nukleinowych.

W drugiej z prac: „Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60)” (*European Polymer Journal*, 2017) przeprowadzono obszerną charakterystykę trzech rodzajów dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten. Obejmowała ona właściwości biofizyczne, ich aktywność hemolityczną, a także cytotoksyczność względem linii komórek nowotworowych (HL-60) i normalnych (B14). Związki te różnią się typem ligandów powierzchniowych: imino-pirydynowych (CRD7, CRD13 i CRD27), pirydynowych (CRD5, 14 i 28) i aminowych (CRD32 i 34). Najmniej toksyczne w stosunku do komórek prawidłowych okazały się związki generacji „0”. Indukowały one natomiast silny efekt cytotoksyczny w komórkach HL-60. Autorka sugeruje, że efekt ten związany jest z hamowaniem przez te związki proliferacji komórek, która zachodzi znacznie szybciej w komórkach zmienionych nowotworowo. Wzrost generacji dendrymerów wpływał na zwiększenie właściwości hemolitycznych oraz wzrost cytotoksyczności badanych związków w obu typach komórek. Przeprowadzona charakterystyka nowych związków zawierających ruten jest niezbędna w poszukiwaniu nowych grup dendrymerów oraz ich modyfikacji do potencjalnego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. Kluczowym elementem jest bowiem wybór związków, które nie są toksyczne dla komórek prawidłowych lub też zapewniona jest odpowiednia równowaga pomiędzy ich aktywnością i toksycznością. Badania wpływu trzech generacji dendrymerów na komórki normalne i nowotworowe wskazują, że to ruten i jego połączenie z dendrymerami powoduje zwiększenie toksyczności w stosunku do komórek nowotworowych.

W trzeciej pozycji zbioru: „Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukemia: *in vitro* studies on HL-60 cells” (*Future Med Chem.*, 2019) przedstawiono wyniki badań właściwości biofizycznych i cytotoksycznych wybranych dendrymerów pierwszej (CRD13) i drugiej (CRD27) generacji. Działanie tych związków określano w stosunku do komórek prawidłowych (PBMC) oraz aktywnie namnażających się komórek leukemicznych linii HL-60. Podobnie jak w poprzednich publikacjach, zastosowane są najnowocześniejsze metody i techniki badawcze. Jest to bardzo obszerna praca obejmująca zarówno analizę ultrastruktury komórek, określenie zmian poziomu wolnych rodników (ROS), potencjału mitochondrialnego, uszkodzeń DNA, jak i próbę wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za działanie cytotoksyczne badanych związków oraz określenie rodzaju śmierci komórki. CRD okazały się bardziej toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych niż normalnych, szczególnie CRD13, który indukuje proces apoptozy w komórkach HL-60. Obecność CRD13 w komórkach HL-60 powodowała bowiem zmiany w ich strukturze charakterystyczne dla wczesnej apoptozy. Badania niniejszej pracy dowodzą stosunkowo niskiej toksyczności badanych związków w stosunku do komórek prawidłowych, co zwiększa możliwość zastosowania ich w praktyce. Związek CRD13 może być potencjalnie rozważany jako lek przeciwnowotworowy, a szczególnie w połączeniu z innymi lekami, może być również użyty do transportu leków.

W obszernych dyskusjach wszystkich trzech prac Autorka umiejętnie porównuje wyniki własne do uzyskanych przez innych autorów cytując adekwatne i aktualne prace, oraz wyciągając właściwe wnioski. Cztery wnioski wynikające z przeprowadzonych badań umieszczone w zakończeniu rozdziału 1 rozprawy są w pełni uzasadnione i sformułowane z należytą ostrożnością. Karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten:

- okazały się bardziej toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych niż normalnych,
- wykazują zdolność kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy i nekroptozy,
- zdolne są do tworzenia kompleksów z wybranymi przeciwnowotworowymi siRNA,

- mają zdolność przenoszenia siRNA do komórek i chronią je przed degradacją przez nukleazy.

Cel badań przedstawionych w pracy został w pełni zrealizowany, a rozprawa udowodniła postawioną przez Doktorantkę hipotezę, że dołączenie rutenu do struktury wybranych dendrymerów zwiększa ich przeciwnowotworowe właściwości.

W czasie lektury tej pracy nasunęły mi się pewne uwagi/pytania, zauważyłam także niefortunne sformułowania i nieścisłości. Niestety, istnieją także błędy edytorskie w już opublikowanych artykułach, szczególnie publikacja nr 3 zawiera wiele drobnych błędów, nie tylko tzw. „literówek”, np.

- w publikacjach występuje brak lub też niepełna informacja o pochodzeniu komórek do badań;
- brak jest jednoznacznej informacji dotyczącej hodowli komórkowych: w jednym miejscu (Cell viability, PBMC) czytamy o hodowli w butelkach, a zdanie niżej (przy HL-60): „Cells (1×10^4 per well) were grown as stated above”. Jeśli „per well”, to jakiej płytki, bo chyba nie na „tissue culture flask”;

- w opisie metody określania poziomu ROS oraz potencjału mitochondrialnego Autorka podaje, że przeprowadziła trzy niezależne eksperymenty, a w wynikach, pod Fig. 8 czytamy, że pochodzą one z sześciu eksperymentów;

- niektóre wyniki podawane są w stosunku do „kontroli”, ale nigdzie w opisie nie ma informacji, co stanowiło kontrolę. Można się domyślać, że kontrolę stanowią komórki nie poddane traktowaniu związkami, ale wówczas w zakresie stosowanych stężeń należy umieścić również stężenie o wartości zero;

- Fig. 6 – w opisie do rysunku są części A, B, C, a na rysunku brak ich oznaczeń;

- brak informacji o tym, co stanowiło kontrolę „Ac” przy analizie „Cytotoksyczności”;

- w Rozdziale 6 Opisu „Działalność naukowa” zastrzeżenie budzi użyta forma "treningi", którą byłoby lepiej zastąpić raczej określeniem, że Doktorantka odbyła "szkolenia, kursy czy staże".

Proszę również o komentarz co do wyboru linii B14 fibroblastów chemicznych jako normalnych komórek kontrolnych w odniesieniu do komórek ludzkiej białaczki. Odpowiednio dobrana hodowla komórkowa, która wykazuje duże podobieństwo do rzeczywiście obecnych w organizmie człowieka pozwoliłaby pewnie odpowiedzieć na szereg dodatkowych pytań.

Za zbyt daleko idące uważam stwierdzenie zawarte w Omówieniu wyników oraz Streszczeniu: „Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badane dendrymery nie wykazują aktywności w stosunku do komórek prawidłowych...”. Badania niniejszej pracy dowodzą bowiem stosunkowo niskiej toksyczności badanych związków w stosunku do komórek prawidłowych, co zwiększa potencjalną możliwość zastosowania ich w praktyce, jednak nie są one całkowicie obojętne.

Moje uwagi, przede wszystkim o charakterze redakcyjnym, nie wpływają na całościową, wysoce pozytywną ocenę omawianej pracy. Błędy te są nieznaczące i nie mają żadnego wpływu na stronę merytoryczną pracy. Wyrażam przekonanie, że Autorka rozprawy osiągnęła stawiane sobie cele. Uzyskane wyniki wskazują, że karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten mogą być rozważane jako potencjalne narzędzia w terapii onkologicznej.

Na uwagę zasługuje aktywność naukowa mgr Sylwii Michlewskiej, która poza cyklem 3 prac składających się na rozprawę doktorską, jest współautorką kolejnych 10 publikacji (łącznie IF - 25,846; pkt. MNiSW – 295) oraz 18 komunikatów zjazdowych, HI = 5. W bieżącym roku Doktorantka ma 3 prace, które ukazały się już w bazie PubMed. Odbyła szereg szkoleń, kursów i staży, również zagranicznych. Jej działalność naukowa była doceniana i nagradzana w postaci listów gratulacyjnych od Rektora UŁ oraz nagrody Dziekana WBiOŚ UŁ za wyniki publikacyjne.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Sylwii Michlewskiej stanowi ważny krok w rozwoju badań nad poszukiwaniem nowych związków jako potencjalnych terapeutyków w leczeniu chorób nowotworowych, a dostarczona wiedza stanowi ważne narzędzie w dalszych badaniach mechanizmu działania związków rutenu. Potwierdzeniem wartości naukowej i praktycznej przeprowadzonych badań jest ich opublikowanie w piśmiennictwie o zasięgu międzynarodowym, finansowanie z kilku projektów badawczych oraz to, że zostały wykonane przy współpracy z czterema zagranicznymi ośrodkami naukowymi.

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Michlewskiej spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Sylwii Michlewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 14 sierpnia 2019 roku

KIEROWNIK
Centralnego Laboratorium Naukowego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. Zofia Pawłowska