



UNIWERSYTET
O P O L S K I

Prof. dr hab. Teresa Janas
ZESPÓŁ BADAŃ EGZOSOMÓW I LIPOSOMÓW
INSTYTUT BIOLOGII
ul. Kominka 6, 6a ; 45-032 Opole
tel. +48 77 401 60 50
fax. +48 77 401 60 51
teresa.janas@uni.opole.pl

22.01.2020

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

wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Gabryelak
w Katedrze Biofizyki Ogólnej Instytutu Biofizyki
na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja poniższa dotyczy poprawionej wersji rozprawy doktorskiej magister Aleksandry Joanny Szwed.

Badania właściwości biologicznych dendrymerów stanowią ważny wkład do rozszerzenia możliwości zastosowań tych związków jako ewentualnych przenośników cząsteczek siRNA w terapiach antynowotworowych. Przykładem takich badań jest rozprawa doktorska mgr Aleksandry J.Szwed, która badała dendrymery hybrydowe karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe (SMT).

Celem badań było:

- a) określenie oddziaływania dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT z wybranymi białkami enzymatycznymi, tj. fosfatazą alkaliczną, dehydrogenazą L-mleczanową oraz aminotransferazą asparaginianową,
- b) określenie wpływu dwóch generacji dendrymerów hybrydowych SMT na mysie linie komórek nerwowych na podstawie analizy wybranych parametrów odpowiedzi komórkowej,
- c) określenie czy hybrydowe dendrymery SMT mogą być potencjalnymi nośnikami dla antyapoptotycznego siRNA.

Rozprawa zawiera 157 stron, w tym: wykaz skrótów, wstęp, cel badań, hipotezy badawcze materiały i metody badawcze, opis wyników badań, dyskusję, wnioski, streszczenie oraz spis literatury zawierający 174 pozycji.

Dorobek naukowy Doktorantki zawiera 8 pozycji literaturowych o łącznym IF=25,303, co przekłada się na 270 punktów MNiSW.

Doktorantka w części, „**Wstęp**” opisuje: dendrymery oraz ich zastosowania, oddziaływanie dendrymerów z białkami, dendrymery jako transportery leków i materiału genetycznego oraz toksyczność dendrymerów *in vitro* oraz *in vivo*.

W następnej części: „**Materiały i Metody**” Doktorantka przedstawia materiały, których używała w swoich badaniach. Następnie opisuje metody, które stosowała, czyli pomiary: gaszenia fluorescencji reszt tryptofanu (Trp) wybranych białek, wyznaczania potencjału zeta, spektropolarimetrii dichroizmu kołowego, transmisyjnej mikroskopii elektronowej, elektroforezę żelową, formowanie dendrypleksów i ich transfekcję, hodowlę komórek, oznaczania właściwości cytotoksycznych dendrymerów, oznaczania poziomu reaktywnych form tlenu przy użyciu sondy H₂DCFDA, oznaczania zmian transbłonowego potencjału mitochondrialnego przy użyciu sondy JC-1, oceny morfologii komórek, określania frakcji komórek apoptotycznych i nekrotycznych, oceny morfologii oraz wizualizacji wyznakowanych fluoresceiną dendrypleksów w komórkach zawieszinowych, oraz ilościowej oceny stopnia wnikania dendrypleksów wyznakowanych fluoresceiną do komórek.

Metody te są właściwie dobrane do wykonania zamierzonych badań.

W części pracy pt. „**Wyniki**” Doktorantka przedstawia swoje oryginalne wyniki badań dotyczących::

- oddziaływania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych z wybranymi białkami enzymatycznymi,
- wpływu dendrymerów hybrydowych na mysie komórki linii N2a oraz mHippoE-18,
- zastosowania dendrymerów karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowych jako ewentualnych nanoosiłników dla cząsteczek siRNA w terapiach genowych.

W oparciu o uzyskane wyniki badań autorka sformułowała następujące wnioski:

1. dendrymery hybrydowe SMT dwóch generacji oddziałują z wybranymi białkami enzymatycznymi (AST, LDH, AP),
2. dendrymery hybrydowe generacji drugiej (SMT2) wykazują cytotoksyczność wobec mysich linii komórek nerwowych mHippoE-18 oraz N2a. Dendrymery hybrydowe generacji pierwszej (SMT1) wykazują cytotoksyczność jedynie wobec mysiej linii komórek nowotworowych N2a,
3. dendrymery hybrydowe SMT generacji pierwszej (SMT1) z dużym prawdopodobieństwem mogą być nośnikami dla siRNA.

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów, Doktorantka: sformułowała wniosek końcowy, że: „dendrymery hybrydowe karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowe generacji pierwszej (SMT1) posiadają korzystniejsze właściwości biologiczne i w związku z tym prawdopodobieństwo

zastosowania ich w medycynie jest większe niż w przypadku dendrymerów generacji drugiej (SMT2)”.

Opis poszczególnych sekcji „Wyników” jest prawidłowy, na przedstawionych wykresach mierzonych zależności są zamieszczone granice błędów pomiarowych. Doktorantka dokonuje analizy ilościowej otrzymanych wyników pomiarów

W części pt. “Dyskusja” autorka przedstawia analizę porównawczą otrzymanych wyników z wynikami badań innych autorów, zawartych w kilkadziesiąt cytowanych artykułach. Grupa tych artykułów jest dobrana umiejętnie i stosownie do badań własnych doktorantki.

Mam do Doktorantki następujące pytania :

1. Jak można wyjaśnić obserwację, że: „pomimo obserwowanej cytotoksyczności *in vitro*, prawie wszystkie dendrymery niskich lub średnich generacji nie wykazują toksyczności *in vivo*”? (cyt z rozdziału:”Toksyczność dendrymerów *in vitro* oraz *in vivo*”)?
2. Sformułowane przez Doktorantkę hipotezy badawcze :2 oraz 3, wydają się niespójne z punktu widzenia medycznych zastosowań dendrymerów?
3. Jaki jest molekularny mechanizm oddziaływania dendrymer–białko, w wyniku którego następuje stopniowe gaszenie fluorescencji reszt tryptofanowych w badanych przez Doktorantkę białkach?
4. Dlaczego badania: gaszenia fluorescencji, potencjału zeta oraz dichroizmu kołowego Doktorantka przeprowadzała w 10 mM buforze fosforanowym a nie w roztworze np. PBS, którego siła jonowa jest kompatybilna z siłą jonową płynów biologicznych?
5. Doktorantka używa heparyny, aby uwalniać molekuly antyapoptotycznego siRNA z wnętrza dendrypleksu. Zatem jaki mechanizm będzie uwalniał cząsteczki siRNA z internalizowanych dendrypleksów we wnętrza komórek docelowych?
6. Jak przygotowywano molekuly siRNA do procesu enkapsulacji przez dendrymery?
7. Proszę wyjaśnić dlaczego do formowania dendrypleksów wybrano stosunek molowy dendrymer/siRNA równy 10:1 a nie inny?
8. W oznaczeniach zmian błonowego potencjału mitochondrialnego, Doktorantka korzysta z matematycznego wyrażenia, w którym jest zawarty tzw. współczynnik fluorescencji. Co oznacza ten współczynnik? Jaka jest zależność matematyczna pomiędzy współczynnikiem fluorescencji i błonowym potencjałem mitochondrialnym?
9. Jak na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji, pochodzącej od siRNA wyznakowanego fluoresceiną, Doktorantka wyznaczyła procent internalizacji dendrypleksów zamkniętych wewnątrz badanych komórek? Proszę o podanie definicji procentu internalizacji, z której Doktorantka korzystała.

10. Doktorantka w Tabeli 2 podaje tzw. ładunek powierzchniowy dla badanych białek? Obecnie ten ładunek podany jest bez jednostki. Co zatem te liczby oznaczają?

11. Doktorantka czasami opisuje i dyskutuje wyniki otrzymanych pomiarów używając wyrażen typu: “pomiar nie wykazał istotnych różnic pomiędzy..”, „...znacząco gasiły fluorescencję”, „... był najmniejszy w stosunku..”, „...silne gaszenie fluorescencji”, „...istotnie wpływają na..”, „...większe zmiany struktury drugorzędowej..”, „...nieznacznie różnią się od..”, „... swoją morfologię a są zbliżone do..”, „...w mniejszym stopniu niż.. Należy takich wyrażen unikać. Natomiast wyniki badań opisywać i dyskutować w sposób jednoznaczny, czyli ilościowy.

12. Dehydrogenaza L-mleczanowa jest izozymem, a nie izoformą jak to jest napisane w treści rozprawy („Dyskusja”).

13. Doktorantka przyjmuje arbitralnie za miarę gaszenia fluorescencji tryptofanu w badanych białkach, jej poziom równy ok. 20% wartości początkowej. W związku z tym wyznaczone stosunki molowe dendrymer/białko są określone z dużym przybliżeniem. Jak na przykład: zarówno SMT1 jak i SMT2 „gaszą” fluorescencję do poziomu ok 20%, dla tego samego stosunku molowego SMT/AST czyli, równego 5:1 a nie 10:1 jak to oszacowała Doktorantka.

14. Moim zdaniem liczba cząsteczek dendrymerów związanych z jedną cząsteczką badanych białek została najdokładniej wyznaczona dla dehydrogenazy mleczanowej LDH, ponieważ dla niej wykresy zależności potencjału zeta od stosunku molowego dendrymerów SMT/LDH charakteryzowały się wyraźnym plateau.

15. Wizualizacje kompleksów dendrymerów SMT z białkami lub siRNA w mikroskopie elektronowym nie są miarodajne, ze względu na denaturujący charakter procedur przygotowywania próbek do pomiarów mikroskopowych. To potwierdza Rycina 26 przedstawiająca zdjęcia z mikroskopu elektronowego otrzymana przez Doktorantkę. Raczej należy wyhodować kryształ białka bądź siRNA bez i w obecności dendrymerów i sporządzić przestrzenny obraz struktury krystalicznej kompleksów.

16. Doktorantka także podważa stosowność wykonywania wizualizacji mikroskopowej, ale ostatecznie konkluduje: “Jednakże, z całą pewnością można stwierdzić, iż doszło do utworzenia kompleksów pomiędzy dendrymerami karbokrzemowo-wiologenowo-fosforowymi, a wybranymi enzymami”. Zatem skąd ta pewność?

17. Doktorantka zauważa na Rycinach 31J oraz 32J wzrost rozmiaru komórek mHippoE oraz N2a pod wpływem dendrymeru SMT2. Jak wyjaśnia tę obserwację?

18. Jaki, najbardziej prawdopodobny, mechanizm internalizacji komórek przez dendrymery lub dendrypleksy może Doktorantka zaproponować na podstawie wyników przeprowadzonych przez siebie badań?

- 19.** Doktorantka określa frakcje komórek: żywych, apoptotycznych oraz nekrotycznych po inkubacji komórek: mHippoE-18 oraz N2a z dendrymerami: SMT1 oraz SMT2 (Tabele 6 i 7). Stosuje metodę „mikroskopową” oraz metodę przy użyciu cytometru przepływowego. Obie metody wykazały wysoki odsetek komórek apoptotycznych (48% oraz 78%) w wyniku ich oddziaływania z dendrymerami SMT2. Natomiast w przypadku SMT1 proces apoptozy przeszło odpowiednio mniej (4% oraz 17%) komórek. Zatem same dendrymery są zdolne do indukowania, w różnym stopniu, apoptozy badanych komórek. Czy może Doktorantka zaproponować mechanizm tej apoptozy?
- 20.** W przypadku gdy Doktorantka korzysta w rozprawie z wyników pomiarów, przez nią wcześniej opublikowanych z innymi współautorami, powinna zamieścić odpowiednie cytowania literaturowe i napisać kto wykonał cytowane pomiary.
- 21.** „Szczelność” dendrypleksów jest problematyczna, ponieważ po inkubacji z RNazą została niewielka ilość siRNA w ich wnętrzu, w porównaniu do kontroli bez RNazy co jest pokazane na Ryc.43. Co jest tutaj kontrolą?
- 22.** Obecnie dendrypleksy są internalizowane do wybranych przez Doktorantkę komórek. Jak zatem dendrypleksy badane przez Doktorantkę będą kierowane do komórek nowotworowych, do których mają być internalizowane *in vivo*?
- 23.** Większość badań Doktorantka przeprowadzała w temperaturze pokojowej (ok.20°C), natomiast *in vivo* mamy temperaturę ok 37°C. Zatem czy wyniki tych badań można aproksymować do sytuacji *in vivo*?
- 24.** W badaniach Doktorantka stosowała siRNA oznakowane sondą fluorescencyjną. Czy ta modyfikacja chemiczna może wpływać na zdolność do wyciszania genu przez tę molekułę?

Reasumując wyrażam opinię, że przedłożona przez mgr Aleksandrę J. Szwed rozprawa doktorska w pełni odpowiada warunkom Ustawy o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Aleksandry J. Szwed do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Teresa Janas