



Wrocław, 04/06/2018

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Szuster, pt.: „**Wpływ dendrymerów PAMAM oraz ich biokoniugatów z biotyną i pirydoksałem na właściwości biologiczne różnych typów komórek *in vitro***”

Praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Wałajtys-Rode, a promotorem pomocniczym był Pan dr Łukasz Uram.

Ocena formalna pracy:

Praca liczy 143 strony, ma typową i odpowiednią strukturę dla tego typu prac doktorskich. Mocno rozbudowany wstęp wprowadzający w zagadnienia dotyczące własności dendrymerów oraz potencjalnych ich zastosowań liczy 48 stron. Cel badań jest sformułowany jasno, prosto, wyraźnie i zajmuje fragment jednej strony.

Rozdział Materiały i Metody to 11 stron maszynopisu. Moim zdaniem, opis materiałów, metod oraz stosowanej aparatury i procedur eksperymentalnych został potraktowany zbyt skrótowo. Taki opis, szczególnie w przypadku stosowanych procedur, w wielu przypadkach utrudnia lub uniemożliwia pełne odtworzenie eksperymentu (np. brak podanych źródeł przynajmniej części odczynników, mediów hodowlanych stosowanych do hodowli komórkowych i suplementów).

Dla przykładu:

W Rozdziałach 3.2-3.4, Doktorantka opisuje metody syntezy zmodyfikowanych dendrymerów PAMAM podając enigmatycznie wydajności sprzęgania na poziomie 92,9% ($G3^{9B}$) oraz 93% ($G3^{9B10PL}$) nie demonstrując wyników analizy i nie podając odnośników do źródeł z tymi danymi. Ponadto, na podstawie podanych mas molowych uzyskanych koniugatów trudno jest oszacować ile cząsteczek biotyny i pirydoksalu (fosforanu pirydoksalu? nie jest jednoznaczne jaki koniugat uzyskano wychodząc z chlorowodoru pirydoksalu) jest związanych z dendrymerem PAMAM. Trudno też ocenić w jaki sposób zmienił się ładunek (rozkład ładunku) tak uzyskanych koniugatów w stosunku do



wyjściowego dendrymeru PAMAM, a jak sama Doktorantka zaznacza we Wstępie, ładunek dendrymeru jest istotnym czynnikiem wpływającym na parametry nośnika. Nie znalazłem też informacji, czy biotyna (lub pirydoksał) sprzężony z dendrymerem jest uwalniany w komórkach z nośnika i czy wykazuje aktywność biologiczną. Bardzo proszę Doktorantkę o wyjaśnienie moich wątpliwości. Podobnie jedynie „na słowo” muszę wierzyć Autorce, że znakowanie izotiocyjanianem fluoresceiny dało taki a nie inny efekt. W moim przekonaniu w/w dane są kluczowe dla interpretacji wyników i oceny pracy doktorskiej i jako takie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej jako analiza lub odnośnik do opublikowanych danych.

W Rozdziale 3.6, na temat prowadzenia hodowli komórek HaCaT, Doktorantka napisała: „Hodowle prowadzono zgodnie z protokołami dostawców” Zgodnie z jakimi protokołami? Jaki jest skład medium? Powinien tu być zamieszczony szczegółowy opis i odnośnik literaturowy lub do protokołu. Zastanawia mnie także wybór niestandardowej metody oceny poziomu indukcji apoptozy w komórkach traktowanych dendrymerami (Rozdział 3.8), poprzez ocenę intensywności sygnału ze związanych przeciwciał (w stosunku do sygnału z barwienia z DAPI) a nie poprzez liczenie komórek pozytywnych względem negatywnych w barwieniu na produkty apoptozy. Apoptoza jest procesem zerojedynkowym, więc pomiar „poziomu apoptozy” w konkretnej komórce tylko jednym wyznacznikiem etapu zaawansowania tego procesu nie da nam żadnych dodatkowych informacji ponad to, że została wyindukowana w przedziale czasowym eksperymentu. Ponadto, taki sposób oceny apoptozy nie pozwala na analizę porównawczą z danymi literaturowymi z hodowli komórkowych uzyskanych standardowymi metodami. Jak na przykład odnieść wartości np. z Wykresu z Ryc.24 do typowych wartości apoptozy w „normalnych” hodowlach fibroblastów BJ na poziomie 0,5% do 2%. W eksperymencie przydałaby się także kontrola pozytywna - np. typowy induktor apoptozy (np. staurosporyna). Ciekawi mnie czy liczone wartości sygnału z każdego „kanału” dla każdego jądra komórkowego czy całkowity sygnał dla pola widzenia? Nie znalazłem tej informacji w opisie. Proszę Autorkę o komentarz. W opisie analiz obrazu technik mikroskopowych (Rozdział 3.11) brakuje informacji o „pinhole”/grubości skrawka w osi Z, o liczbie komórek poddanych analizie w każdym



eksperymentcie oraz informacji dlaczego wybrano opcję „pomiaru powierzchni” zamiast całkowitej intensywności fluorescencji obszaru.

Rozdział Wyniki (27 stron) zawiera krótko i konkretnie przedstawione rezultaty eksperymentów nad cytotoksycznością zsyntetyzowanych dendrymerów oraz ocenę ich wpływu na poziom cytokin Il-1 α i TNF- α . Kolejny rozdział Dyskusja mieści się na 13 stronach. Kolejne części pracy to: Podsumowanie (2 strony) , Wnioski (1 strona), Bibliografia (28 stron, 479 pozycji literaturowych), Streszczenie, dwustronicowy Abstract oraz Dorobek naukowy, składający się z 5 pozycji literaturowych w znacznym stopniu pokrywający się z tematyką pracy doktorskiej, jednakże Pani mgr Magdalena Szuster w żadnej z tych prac nie jest pierwszym autorem.

Na szczególne podkreślenie i uznanie zasługuje edytorska strona pracy. Jest ona praktycznie pozbawiona błędów edytorskich, żargonu laboratoryjnego oraz laboratoryjnych skrótów myślowych.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska dotyczy bardzo istotnego aspektu współczesnej nauki, a mianowicie nanobiotechnologii w aspekcie praktycznym w biotechnologii i medycynie.

W ostatnich latach ta dziedzina wiedzy rozwija się intensywnie i jest związana m.in. z bardzo wysokim potencjałem aplikacyjnym wyników badań w nanomedycynie i spersonalizowanej medycynie opartej o terapię celowaną, czyli ukierunkowaną na konkretną grupę komórek, tkanek czy narząd. Kluczowym elementem dla jej skuteczności (farmakoterapii lub terapii genowej) jest opracowanie efektywnego, wydajnego, swoistego oraz nietoksycznego nośnika leków. Aktualnie dendrymery testuje się do tego celu, a ocena ich potencjalnej toksyczności w modelu komórkowym wpisuje się we współczesne trendy rozwoju nanobiotechnologii. Praca doktorska Pani mgr Magdaleny Szuster wpasowuje się więc bardzo dobrze we współczesny nurt badawczy i niesie ze sobą potencjał aplikacyjny.

W mojej ocenie tytuł pracy nie odzwierciedla w pełni ani jej celu ani zawartości merytorycznej, jest zbyt szeroki w stosunku do podjętego zakresu prac. Autorka analizowała bowiem tylko nieliczne, wybrane właściwości biologiczne i to tylko w jednym wymiarze

czasowym (cytotoksyczność, przenikalność/retencja oraz lokalizacja dedrymerów, modulacja syntezy wybranych cytokin prozapalnych).

Wstęp:

Daje bardzo dobrą ogólną ilustrację aktualnego stanu wiedzy o nośnikach i drogach ich przenikania oraz na temat dendrymerów, strategii projektowania, syntezy i aktualnych trendów rozwojowych. Jako taki bardzo dobrze nadaje się jako ewentualny element pracy przeglądowej w tej tematyce. Natomiast pozostawia pewien niedosyt w kwestii pokazania konkretnych właściwości dendrymerów, szczególnie z grupy PAMAM, mających istotny wpływ na konkretne parametry analizowane w eksperymentalnej części pracy, w modelach *in vitro* zbliżonych do stosowanych przez Autorkę.

Wyniki:

Autorka przedstawionej mi do oceny pracy, sformułowała następujące cele badawcze (str. 54): „zbadanie wpływu dendrymerów PAMAM G3 na szereg właściwości biologicznych trzech linii komórkowych: fibroblastów BJ, linii uniesmiertelnionych keratynocytów (HaCaT) oraz linii komórkowej raka płaskonabłonkowego (SCC-15)”. Ponieważ w rozprawie nie znalazłem zbyt wielu argumentów uzasadniających wybór takich a nie innych linii komórkowych do realizacji celu pracy, proszę Doktorantkę o uzasadnienie wyboru w ramach dyskusji na publicznej obronie pracy doktorskiej.

Dla realizacji projektu, Autorka określiła swoje częściowe cele, takie jak: cytotoksyczność, „mobilność”, internalizacja dendrymerów oraz zdolność indukcji wybranych cytokin prozapalnych. Zaplanowany zestaw prac eksperymentalnych i technik badawczych zastosowanych przez Doktorantkę jest odpowiedni. Autorka wykazała się biegłością w ich stosowaniu i interpretacji wyników. Interpretacja wyników jest odpowiednia, nie znalazłem istotnych nadinterpretacji wyników, a konkluzje z uzyskanych danych są formułowane prawidłowo.

Dla realizacji zamierzonego celu, badania zaplanowano na trzech w/w liniach komórkowych, o bardzo zróżnicowanych właściwościach i zdecydowanie różniących się zdolnością i szybkością proliferacji: od 1-go dnia (keratynocyty) do ponad 5-ciu dni (komórki nowotworowe). Ze względu na prowadzenie eksperymentów na hodowlach bez



synchronizacji, wyniki niektórych testów związanych z internalizacją i lokalizacją jądrową mogą sprawiać problemy interpretacyjne ze względu na wpływ cyklu komórkowego w liniach szybko proliferujących (wyższy procent komórek mitotycznych/ postmitotycznych).

Mam pewne wątpliwości co do zastosowanych stężeń dendrymerów w testach cytotoksyczności (Ryc. 23AB). Dotyczy to szczególnie zakresu wyższych stężeń dendrymerów, gdzie większe zagęszczenie punktów pomiarowych pozwoliłoby na bardziej precyzyjną ocenę. Ponadto, pomimo, że eksperyment przeprowadzany był w krótkiej skali czasowej (24h), dla wszechstronnej oceny wyników przydałaby się ocena całkowitej ilości komórek (lub ekwiwalentnie analiza półilościowa np. z sulforodaminą B). Analiza wyników z Ryc. 25A wskazuje na możliwość obniżenia ilości komórek przyklejonych do podłoża w stosunku do wyjściowej liczby komórek przynajmniej w eksperymentach z fibroblastami BJ w wysokich stężeniach dendrymerów.

Autorka wykazała, że koniugaty BC są mniej toksyczne od wyjściowego dendrymeru PAMAM. Podobnie niższy był poziom indukcji apoptozy we wszystkich liniach komórkowych dla biokoniugatów w warunkach testu (Ryc. 24-27).

Analiza wpływu dendrymerów na migrację komórek metodą „testu zarastania rysy” wykazała brak różnic przy niskich stężeniach dendrymerów (Ryc. 28-29) z wyjątkiem komórek SCC-15 ($0,1 \mu\text{M}$). Natomiast istotne statystycznie różnice w wysokich stężeniach pomiędzy dendrymerami można interpretować także jako efekt wyższej cytotoksyczności dendrymeru PAMAM w stosunku do biokoniugatu, co uwidoczniono w testach cytotoksyczności oraz odklejaniu się komórek (Ryc. 25A). Jakość przedstawionej dokumentacji eksperymentu nie pozwala mi na jednoznaczną interpretację w tym względzie, w oparciu o przedstawione dane w pracy doktorskiej.

W eksperymentach nad oceną zdolności przenikania do wnętrza komórki oraz kolokalizacji nośników ze strukturami subkomórkowymi, Autorka powinna przedstawić przykładowe zdjęcia w wysokiej rozdzielczości, precyzyjnie dokumentujące przykładowe lokalizacje i dystrybucję dendrymerów. Zamieszczone wydruki nie pozwalają na rzetelną analizę takich danych. Dotyczy to szczególnie analiz kolokalizacji dendrymerów z mitochondriami. Dla analiz jądrowych można było, moim zdaniem, zamienić kolory na lepiej uwidaczniające



kolokalizację dendrymerów w jądrze komórkowym, np. „kanał” DAPI jako czerwony, przy pozostawieniu kanału FITC jako zielonego.

Mam wątpliwości co do układu eksperymentalnego służącego do oceny poziomu IL-1 α . Zmiana medium na 2%FBS powoduje zmianę aktywności sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i „wymusza” adaptację komórek do nowego medium z obniżonym poziomem stymulatorów. Ryc. 35 wskazuje na wysoki poziom IL-1 α po 12 godzinach i spadek po 24 godzinach, co może być wynikiem adaptacji do nowych warunków hodowli. W fibroblastach zmiana medium na 2% FBS powoduje szereg zmian w sygnalizacji, w tym poprzez kinazę białkową C. W keratynocytach może być podobnie.

Uzyskane dane wykazały, że dendrymery PAMAM w stężeniu 1 μ M powodują obniżenie poziomu IL-1 α w porównaniu do biokoniugatów w komórkach keratynocytów oraz, że efekt ten występuje niezależnie od czynnika indukującego IL-1 α zastosowanego w teście (estry forbolu, LPS czy GroL).

W związku z tym nasuwa się pytanie do Doktorantki: czy własności dendrymerów PAMAM i biokoniugatów różnią się ze względu na aktywność biologiczną biotyny i pirydoksalu czy ze względu na zmianę powierzchni biokoniugatów oraz zmianę ładunku?

Podsumowanie:

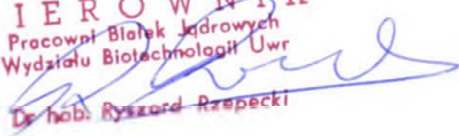
Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i istotną pracę badawczą. Zamierzenia badawcze przedstawione w Celu pracy zostały osiągnięte. Wyniki badań i wysnute wnioski przedstawione w rozprawie mają istotne znaczenie naukowe i są potencjalnie aplikacyjne. Rozprawa doktorska została napisana przejrzysto, klarownie i bardzo uważnie pod względem edytorskim. Zauważone błędy, pominięcia, szczególnie w opisie Materiałów i Metod oraz moja krytyka tej części, nie umniejszają wartości poznawczej rozprawy.

W moim przekonaniu, przedstawiona mi do oceny praca spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Szuster do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym dysertacjom na stopień doktora, określonym w Art. 13, Ust. 1 Ustawy z dnia 14

marca 2003r oraz z późniejszymi zmianami (Dz. Ustaw z 2016r., poz. 882) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Ryszard Rzepecki

KIEROWNIK
Pracowni Biłek Jądrowych
Wydziału Biotechnologii UWr

Dr hab. Ryszard Rzepecki