



Prof. dr hab. Halina Kleszczyńska
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy w Wrocławiu

Wrocław, 7 sierpnia 2019 r.

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Michlewskiej
pt.: "Przeciwnowotworowe właściwości dendrymerów zawierających ruten"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Sylwii Michlewskiej dotyczy kluczowych dla medycyny współczesnej badań, prowadzonych na całym świecie, nad poszukiwaniem nowych skutecznych leków przeciwnowotworowych, o możliwie zminimalizowanym działaniu ubocznym. Skuteczna pomoc w leczeniu ludzi dotkniętych tą chorobą jest niezmiernie ważnym wyzwaniem dla świata nauki, tym bardziej, że rośnie ciągle, zarówno w Polsce, jak i na świecie liczba zgonów osób dotkniętych różnego rodzaju nowotworami. Bardzo groźnym nowotworem występującym u dzieci w różnym wieku jest białaczka. W związku z tym Doktorantka podjęła się nowatorskich badań, dotyczących możliwości wykorzystania, w celu ratowania życia ludzkiego, karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten, w leczeniu groźnego nowotworu krwi, jakim jest białaczka.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania te zostały przeprowadzone i finansowane z grantów (IRSES i NAVA) oraz ze środków Unii Europejskiej, a także zrealizowane w ramach współpracy z ośrodkami zagranicznymi, w Hiszpanii, Białorusi, Słowacji i Łotwie. Szeroka współpraca międzynarodowa niewątpliwie świadczy o randze badań, związanych z ochroną życia ludzi dotkniętych chorobami nowotworowymi.

Przeprowadzone w ramach tej pracy doktorskiej badania miały na celu określenie aktywności przeciwnowotworowej karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten, z myślą o możliwości wykorzystania ich jako nośników kwasów nukleinowych, o zwiększonej skuteczności dzięki zawartości rutenu.

Rozprawę doktorską stanowią trzy oryginalne prace twórcze o charakterze doświadczalnym, które zostały opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach



znajdujących się na liście „A” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz ujętych w Journal Citation Reports. Są to zastępujące monotematyczne publikacje:

1. Michlewska S., Ionov M., Shcharbin D., Maroto-Díaz M., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., 2017, Ruthenium metallodendrimers with anticancer potential in an acute promyelocytic leukemia cell line (HL60). *European Polymer Journal* 87: 39-47.
2. Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Loznikova S., Shcharbin D., Maly M., Gomez Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., 2018, Ruthenium dendrimers as carriers for anticancer siRNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* 181: 18-27.
3. Michlewska S., Ionov M., Maroto-Díaz M., Szwed A., Ihnatsyeu-Kachan A., Abashkin V., Dzmitruk V., Rogalska A., Denel M., Gapińska M., Shcharbin D., Gomez Ramirez R., Javier de la Mata F., Bryszewska M., 2019, Ruthenium dendrimers against acute promyelocytic leukaemia. *In vitro* studies on HL-60 cells. *Future Medicinal Chemistry* DOI: 10.4155/fmc-2018-0274.

Całkowity impact factor tych prac wynosi 10,8 (IF = 3,348+3,485+3,969), a całkowita liczba punktów według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego ma wartość 110 (35+35+40), O udziale Doktorantki w tym pracach świadczy fakt, że jest Ona na pierwszym autorem, a w pracy nr 3 także współautorem korespondencyjnym. Ponadto z oświadczeń współautorów wynika, że udział pani mgr Sylwii Michlewskiej w tych pracach jest dominujący i w podanej wyżej kolejności prac wynosi odpowiednio: 82, 62 i 60 %.

Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała trzy rodzaje dendrymerów karborkrzemowych zawierających ruten i posiadających następujące typy ligandów powierzchniowych: imino-pirydynowe, pirydynowe i aminowe (8 związków). Wpływ tych substancji został określony w odniesieniu do: prawidłowych jednojądrzastych komórek krwi obwodowej, komórek nowotworowych białaczki promielocytowej (linii HL-60), erytrocytów



izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców i błon erytrocytów. Badania dotyczyły również przeciwnowotworowego siRNA.

Pani mgr Sylwia Michlewska zastosowała w pracy szereg nowoczesnych technik badawczych, aby zrealizować cel badań, W szczególności wykorzystwała transmisyjną mikroskopię elektronową TEM i konfokalną, fluorymetrię, spektroskopię absorpcyjną, dichroizm kołowy, elektroforezę żelową, cytometrię przepływową oraz przeprowadziła testy MTT i AlamarBlue, a także symulacje komputerowe. Zastosowane metody pozwoliły m. in. określić właściwości fizyczne i cytotoksyczne dendrymerów karbokrzemowych zawierających ruten oraz stopień internalizacji kompleksów tworzonych przez dendrymery z siRNA do komórek HL-60, potencjał błonowy zeta, poziom reaktywnych form tlenu w komórkach oraz stopień uszkodzeń DNA.

W tym miejscu pozwolę sobie na krytyczną uwagę łączenia przez Doktorantkę wykorzystanych metod eksperymentalnych z badanymi procesami lub wielkościami fizycznymi (parametrami) wyznaczonymi tymi metodami. Np. proces hemolizy jest badany na podstawie procentu hemolizy wyznaczonego metodą spektrofotometryczną, natomiast polaryzację fluorescencji oblicza się na podstawie badań fluorymetrycznych.

Przeprowadzone eksperymenty, zawarte w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską pozwoliły Doktorantce zrealizować cel badań określony w rozprawie i sformułować cztery najważniejsze wnioski. Pani mgr Sylwia Michlewska wykazała w nich, że: karbokrzemowe dendrymery zawierające ruten są bardziej toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych niż do komórek prawidłowych; wykazują zdolność kierowania komórek nowotworowych na drogę apoptozy i nekroptozy; wykazują zdolność tworzenia kompleksów z przeciwnowotworowymi siRNA oraz skutecznie przenoszą siRNA do komórek nowotworowych i chronią je przed degradacją przez nukleazy.

W szczególności bardzo ważne są wyniki przeprowadzonych badań, które pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch dendrymerów z imino-pirydynowymi grupami terminalnymi, charakteryzujących się silną toksycznością w stosunku do komórek nowotworowych HL-60, a nie mających wpływu na komórki prawidłowe. Dendrymery te mogą zatem być



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

zakwalifikowane do dalszych specjalistycznych badań *in vitro*, z nadzieją wykorzystania w praktyce, jako skuteczniejsze leki przeciwnowotworowe nowej generacji.

Należy wyraźnie podkreślić, że pani mgr Sylwia Michlewska, wykazała się dużą aktywnością naukową. Oprócz prac stanowiących rozprawę doktorską, jest współautorką 10 artykułów naukowych opublikowanych w dobrych czasopismach znajdujących się na liście JCR, których sumaryczny impact factor wynosi 25,846, a liczba punktów MNiSW ma wartość 295. Prace te były 68 razy cytowane. Doktorantka jest także współautorką 18 komunikatów z międzynarodowych konferencji krajowych i zagranicznych. Całkowity impact faktor (IF) wszystkich 13 prac Doktorantki jest wysoki i wynosi 36,648, a liczba punktów MNiSW tych prac ma wartość 405, zaś liczba cytowań 72.

W ramach popularyzacji nauki wśród młodzieży szkolnej Doktorantka, oprócz swoich podstawowych obowiązków, poświęciła dużo czasu m. in. na prowadzenie warsztatów w ramach różnych programów realizowanych przez Uniwersytet Łódzki. Opiekowała się także gośćmi zagranicznymi z Białorusi, Ukrainy, Łotwy, Słowacji i Hiszpanii, przebywającymi na stażu naukowym na Uniwersytecie Łódzkim. W latach 2015 - 2019 Doktorantka brała czynny udział w wielu kursach, szkoleniach i stażach naukowych, zarówno w ośrodkach naukowych w kraju (Łódź i Warszawa), jak i za granicą (Białoruś, Portugalia, Słowacja, Hiszpania i Łotwa). W 2016 roku została wyróżniona Nagrodą Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego za prace opublikowane w roku 2015.

Oceniając wartość naukową rozprawy, należy podkreślić, że badania w niej zawarte są nowatorskie, dostarczają bowiem szereg cennych informacji z zakresu biofizyki, biologii i medycyny, dotyczących cytotoksycznych właściwości karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten, z myślą o możliwości ich wykorzystaniu, jako skuteczniejszych leków przeciwnowotworowych nowej generacji, a także jako nośników kwasów nukleinowych w terapii genowej.

Wartość merytoryczną pracy podnoszą liczne i zróżnicowane badania z użyciem nowoczesnych technik eksperymentalnych, z udziałem specjalistów w danej dziedzinie nauki z kraju i zagranicy, którzy badania koordynowali i planowali, lub pełnili rolę konsultantów i ekspertów. Badania bowiem, w tej pracy doktorskiej były przeprowadzone w ramach projektów



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

międzynarodowych, w których uczestniczyli naukowcy z różnych zagranicznych ośrodków naukowych. W związku z tym są Oni współautorami publikacji, wchodzących w skład pracy doktorskiej pani mgr Sylwii Michlewskiej. Mieli m.in. merytoryczną kontrolę nad syntezą użytych w pracy zróżnicowanych strukturalnie karbokrzemowych dendrymerów zawierających ruten, pełnili rolę konsultantów i ekspertów, w ramach swojej specjalności naukowej, biorąc udział w interpretacji wyników dużej ilości nowatorskich badań, podczas przygotowywania finalnej wersji publikacji. Jak wynika z oświadczeń współautorów publikacji, w większości swój udział szacują na poziomie 3 %.

Jestem przekonana, że użyte w tej pracy substancje, po przejściu dalszych specjalistycznych badań i testów, w szczególności *in vivo*, będą mogły być zastosowane w medycynie jako nowe leki, poprawiające skuteczność leczenia pacjentów dotkniętych chorobą nowotworową, w szczególności białaczką.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Michlewskiej w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w (Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami) Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku w Dziale V, Rozdziale 2, Oddziale 1 art. 187.

Uważam, zatem, że przedłożona mi do recenzji rozprawa jest podstawą do nadania Doktorantce stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka. W związku z powyższym, zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczeniem mgr Sylwii Michlewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.