

Łódź, dnia 11 października 2023r.

**Ocena rozprawy na stopień doktora nauk biologicznych**

**mgr Małgorzaty Kubczak**

**pt: „Properties and application of tyrosine-modified and unmodified polyethyleneimine polymers as siRNA carriers”**

**wykonanej**

**w Katedrze Biofizyki Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego**

**pod kierunkiem prof. dr. hab. Maksima Ionova i prof. dr. Achima Aignera**

Dysertacja przedstawiona do recenzji podejmuje problematykę dotyczącą zastosowania techniki interferencji RNA (RNAi) w leczeniu chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych. Opiera się na wyciszaniu genów, których aktywność leży u podłoża patologii. Istotną kwestią w uzyskaniu skuteczności takiej terapii jest dostarczenie cząstki czynnej do odpowiednich komórek organizmu, co ze względu na właściwości fizykochemiczne nastręcza pewne trudności. Mgr Małgorzata Kubczak postanowiła opisać właściwości polimerów polietylenoiminowych (PEI) oraz ich odpowiedników modyfikowanych tyrozyną, jak również zbadać zdolność kompleksów polimer/siRNA do wnikania do komórek docelowych oraz zachowania właściwości terapeutycznych substancji czynnej.

**Ocena struktury i zawartości merytorycznej dysertacji**

Przedstawiona do oceny rozprawa ma współczesny układ i składa się z części opisowej, będącej szerokim podsumowaniem załączonych w dalszej części 4 publikacji, składających się na niniejszą dysertację. Publikacje obejmują jedną pracę przeglądową i 3 oryginalne. Łączny IF zawartych w dysertacji publikacji wynosi 34,43, a liczba punktów MEiN 540. Ostatnia część dysertacji obejmują oświadczenia współautorów o współudziale w publikacjach.

W rozdziale *Introduction* Doktorantka w sposób zwięzły przedstawia szereg informacji dotyczących specyfiki terapii opartych na siRNA oraz trudności związanych z dostarczeniem substancji czynnej do odpowiednich komórek. Szczególną uwagę zwraca na stosowane obecnie wektory wirusowe, które nie są doskonałym nośnikiem m.in. ze względu na właściwości

pobudzające odpowiedź immunologiczną. Następnie koncentruje się na nanocząstkach ze szczególnym uwzględnieniem kationowych polimerów polietylenoiminowych w kontekście możliwości ich zastosowania jako nośników w terapii opartych na działaniu siRNA. Tym samym Doktorantka przygotowuje doskonały grunt pod zrozumienie licznych aspektów merytorycznych ujętych w publikacji przeglądowej załączonej do dysertacji:

- (1) Kubczak M, Michlewska S, Bryszewska M, Aigner A, Ionov M. *Nanoparticles for local delivery of siRNA in lung therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2021 Dec;179:114038. doi: 10.1016/j.addr.2021.114038.*

W części opisowej dysertacji Doktorantka przedstawia i uzasadnia *cel* pracy, który obejmuje opisanie właściwości polimerów polietylenoiminowych (PEI) oraz ich odpowiedników modyfikowanych tyrozyną. Główny cel zrealizowany został w trzech zadaniach badawczych obejmujących: (1) badanie biofizycznych właściwości wybranych PEI w celu identyfikacji i selekcji najbardziej obiecujących polimerów do dalszych eksperymentów, (2) badanie biofizycznych właściwości kompleksów siRNA/polimer i ich skuteczności w warunkach *in vitro* i *ex vivo*, (3) badanie zdolności polimerów do wchodzenia w interakcje z ludzką albuminą.

W kolejnych rozdziałach *Materials and Methods* Doktorantka zwięźle przedstawia metody badawcze zastosowane w pracy. Metody te są bardzo dokładnie opisane w poszczególnych publikacjach oryginalnych wchodzących w skład dysertacji. Należy podkreślić, że do realizacji celów Doktorantka zastosował dużą liczbę zaawansowanych metod badawczych, które w pełni pozwoliły na realizację wyznaczonych celów pracy. Znajomość szerokiego wachlarza metod świadczy o wszechstronności i swobodzie metodologicznej Doktorantki i jej doskonałym przygotowaniu do realizacji postawionych zadań badawczych.

W rozdziale *Results* mającym cechy dyskusji Doktorantka przedstawia i interpretuje wyniki uzyskane w toku realizacji zaplanowanych trzech zadań badawczych. W pierwszym etapie potwierdza, że modyfikacja tyrozyną ma kluczowe znaczenie dla właściwości PEI i kompleksowania z siRNA. W wyniku realizacji drugiego zadania Doktorantka potwierdza, że dzięki zmianom konformacyjnym kompleksy polimer/siRNA mają zdolność wnikania do komórek, nie uszkadzając ich błony komórkowej i nie wywołując efektu cytotoksycznego i wykazując przy tym oporność wobec komórkowych endonukleaz. siRNA zawarte w kompleksie jest w stanie wyciszać ekspresję docelowych genów. Podczas realizacji zadania trzeciego Doktorantka wykazuje, iż polimery modyfikowane tyrozyną są zdolne do interakcji z ludzką albuminą oraz opisuje możliwe mechanizmy zapewniające tworzenie tych interakcji. Wyniki zostały zanalizowane za pomocą właściwie dobranych metod statystycznych. Wyniki

przedstawione w dysertacji są dokładnie opisane i przedyskutowane w następujących publikacjach oryginalnych:

- (2) Kubczak M, Michlewska S, Karimov M, Ewe A, Aigner A, Bryszewska M, Ionov M. *Comparison of tyrosine-modified low molecular weight branched and linear polyethylenimines for siRNA delivery. Nanotoxicology. 2022 Nov-Dec;16(9-10):867-882. doi: 10.1080/17435390.2022.2159891.*
- (3) Kubczak M, Grodzicka M, Michlewska S, Karimov M, Ewe A, Aigner A, Bryszewska M, Ionov M. *The effect of novel tyrosine-modified polyethyleneimines on human albumin structure - Thermodynamic and spectroscopic study. Colloids Surf B Biointerfaces. 2023 Jul;227:113359. doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113359.*
- (4) Kubczak M, Michlewska S, Bryszewska M, Aigner A, Ionov M. *Nanoparticles for local delivery of siRNA in lung therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2021 Dec;179:114038. doi: 10.1016/j.addr.2021.114038.*

Dyskusję uzyskanych wyników prowadzi Doktorantka zwięźle i krytycznie z wykorzystaniem aktualnego piśmiennictwa. Dyskusja została w szerokim zakresie przeprowadzona w każdej z publikacji oryginalnych w sposób wielowątkowy, jednakże bardzo przejrzysty, co pokazuje duży zasób wiedzy Doktorantki oraz umiejętność właściwego doboru argumentów i danych literaturowych. Wskazuje również na zrozumienie przez Doktorantkę złożonych kwestii podejmowanego problemu badawczego. W podsumowaniu Doktorantka stwierdza, iż polimery modyfikowane tyrozyną działały efektywniej jako nośniki siRNA, wykazując niski efekt cytotoksyczny i obiecującą skuteczność wyciszenia ekspresji genu docelowego. Umiejętność analizy i interpretacji uzyskanych wyników wskazuje na niezwykle dynamiczny rozwój naukowy Doktorantki, jaki nastąpił podczas realizacji badań oraz bogate doświadczenie, które zapewne zaprocentuje w najbliższej przyszłości.

## **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi rzetelne, wartościowe, oryginalne i samodzielne opracowanie naukowe. Doktorantka podjęła się niezwykle ambitnego zadania, prawidłowo zaplanowała pracę, uzasadniła podstawę merytoryczną prowadzonych badań, właściwie sformułowała i zrealizowała cele badawcze, a z uzyskanych wyników wyciągnęła szereg interesujących wniosków. Dysertacja jest dobrym przykładem podejścia koncepcyjnego do wybranego problemu naukowego. Praca wnosi bardzo duży wkład w dotychczasową wiedzę w badanym zakresie.

Dlatego uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dn. 20 lipca 2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce  
Niniejszym przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Kubczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoką wartość dysertacji, zastosowanie nowoczesnych metod badawczych i wykonanie dogłębnej, krytycznej analizy nakreślonego tematu, jak również unikalny wymiar badań uzyskanych, zwracam się do Komisji o uznanie rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kubczak za wyróżniającą.

Dr hab. n med. Maciej Chałubiński, prof. UM