



Dr hab. Hanna Pruchnik

Wrocław, 3.09.2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Kubczak, zatytułowanej:**  
**„Właściwości i zastosowanie polimerów polietylenoiminowych modyfikowanych i**  
**niemodyfikowanych tyroziną jako nośników siRNA”**  
*“Properties and application of tyrosine-modified and unmodified*  
*polyethyleneimine polymers as siRNA carriers”*

Przedłożona do recenzji dysertacja ma interdyscyplinarny charakter i została przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Maksima Ionova z Zakładu Biofizyki Ogólnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz prof. Dr. Achima Aignera z Rudolf Boehm Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, Medical Faculty, University of Leipzig. Prace badawcze były prowadzone w ramach kilku projektów, w tym częściowo finansowane z grantu NCN (2018/31/F/NZ5/03454) oraz Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; AI 24/24-1.) w ramach programu "BEETHOVEN LIFE 1" "*Nowe polimerowe nanocząstki do płucnej terapii kwasami nukleinowymi - synteza, analiza toksykologiczna i ocena biologiczna /terapeutyczna*".

Rozprawa doktorska została przedstawiona w formie czterech powiązanych tematycznie artykułów wraz z opisem. Dysertacja jest spójna i tworzy dobrze udokumentowaną, napisaną w sposób zwięzły, logiczną całość. Pierwsza część rozprawy, omawiająca osiągnięcie składa się z kilku rozdziałów: wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, opis wyników, wnioski oraz podsumowanie. Następnie przedstawiono streszczenie pracy w języku polskim, a na końcu składający się z 56 pozycji spis cytowanej, aktualnej w omawianym temacie literatury. W dalszej kolejności zamieszczono spis publikacji włączonych do dysertacji, spis całości dorobku naukowego i osiągnięć Doktorantki oraz oświadczenia współautorów publikacji. Sam opis/tekst, w tym strona pisarska i edytorska są niemal bezbłędne.

Podstawą dysertacji są trzy oryginalne prace opublikowane w czasopismach z listy JCR:



- *International Journal of Pharmaceutics*, 121468, 0378-5173, 2022. IF = 6,51; 100 pkt. MEiN,
- *Nanotoxicology*, Nov-Dec;16(9-10): 867-882, 2022. IF= 5,881; 140 pkt. MEiN,
- *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 227, 113359, 2023. IF = 5,999; 100 pkt. MEiN,

oraz artykuł przeglądowy w czasopiśmie

- *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114038, 0169-409X, 2021. IF = 16,04; 200 pkt. MEiN.

Łączny współczynnik *impact factor* prac to 34,43 a sumaryczna liczba punktów MEiN wynosi 540. Wyniki badań opublikowano w renomowanych czasopismach, a zatem praca naukowa została już zweryfikowana i pozytywnie oceniona przez niezależnych specjalistów z danej dyscypliny. Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami wkład Doktorantki w powstanie publikacji jest istotny i wynosi odpowiednio 65%, 64%, 65% i 70%. Pani mgr Małgorzata Kubiczak brała udział w opracowaniu koncepcji artykułów, zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty, zinterpretowała, opracowała i przeanalizowała uzyskane dane. Należy zaznaczyć, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w trzech pracach badawczych autorem korespondencyjnym. O dużym zaangażowaniu w pracę naukową świadczy również imponujący całkowity dorobek mgr Małgorzaty Kubiczak. Oprócz publikacji stanowiących rozprawę doktorską Doktorantka jest współautorką 11 artykułów (IF=49,327 i 1200 punktów MEiN), brała aktywny udział w 18 konferencjach, była wykonawcą w dwóch projektach oraz kierownikiem realizowanego obecnie grantu PRELUDIUM 19 (01.02.2021 - 31.01.2024), zatytułowanego: „*Polimery politylenoiminowe modyfikowane tyrozyną jako potencjalne nośniki siRNA w synergistycznej terapii nowotworu*”. Doktorantka uczestniczyła również w licznych warsztatach i spotkaniach, odbyła także staże naukowe. Za swoje osiągnięcia wielokrotnie otrzymywała nagrody i wyróżnienia.

Wszystkie te dokonania świadczą o ciągłym rozwoju i wszechstronnym zdobywaniu doświadczenia naukowego przez Doktorantkę. W szczególności prowadzenie badań we współpracy z innymi ośrodkami sprzyja poszerzaniu wiedzy i warsztatu metodologicznego. Utwierdza mnie to w przekonaniu, że Doktorantka posiada szeroką wiedzę w zakresie realizowanego tematu badawczego oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



W swojej pracy doktorskiej mgr Małgorzata Kubczak zajęła się problematyką bardzo ważną w aspekcie zdrowia człowieka, dołączając do szerokiego grona badaczy zajmujących się poszukiwaniem/testowaniem i doskonaleniem nowych nanonośników jako skutecznych narzędzi farmakologicznych. Badania prowadzone przez Doktorantkę są istotne ze względu na potencjalne zastosowanie technologii RNAi (terapia oparta na interferencji RNA) w leczeniu wielu chorób nowotworowych, zaburzeń neurodegeneracyjnych i chorób autoimmunologicznych. Spośród wielu dostępnych nanonośników siRNA na szczególną uwagę zasługują polimery kationowe, ze względu na wydajne i nietoksyczne mechanizmy dostarczania siRNA do komórek. Unikalne właściwości tych cząsteczek pozwalają na zasadniczo nieograniczone możliwości w zakresie ich projektowania i modyfikacji. Toteż wybór tematu badawczego jest jak najbardziej zasadny.

Celem badań opisanych w pracy było porównanie oraz charakterystyka właściwości biofizycznych/biologicznych polietylenoimin (PEI) o różnej masie cząsteczkowej, liniowych i rozgałęzionych, modyfikowanych tyrozyną oraz niemodyfikowanych. Przyjęto hipotezę, iż modyfikacja polimerów tyrozyną ma kluczowe znaczenie dla właściwości PEI i ich kompleksowania z siRNA. W celu weryfikacji założeń zaplanowano kilka etapów badań - sprecyzowano zadania badawcze, które konsekwentnie realizowano, a dokładny ich opis i uzyskane wyniki opublikowano. W zależności od rodzaju zadania zastosowano szereg właściwie dobranych technik i metod badawczych:

- pomiary potencjału zeta i wielkości cząsteczek, odpowiednio: polimerów, kompleksów polimer/siRNA oraz albuminy (HSA),
- transmisyjna mikroskopia elektronowa,
- test hemolityczny,
- spektroskopia fluorescencyjna,
- test MTT,
- test kometowy w wersji alkalicznej,
- test LDH,
- test JC-1 i pomiary luminometryczne,
- dichroizm kołowy,
- elektroforeza w żelu agarozowym,
- indukcja kaspazy-3/7,
- pomiary potencjału błony mitochondrialnej,
- pomiary reaktywnych form tlenu,
- analiza qPCR ekspresji genów z eksperymentów *in vitro* i *ex vivo*,



- pomiary aktywności lucyferazy,
- mikroskopia konfokalna,
- cytometria przepływowa.

Wszystkie eksperymenty zostały starannie zaplanowane i wykonane.

Cykl prac wchodzących w skład rozprawy rozpoczyna artykuł przeglądowy pt. „*Nanoparticles for local delivery of siRNA in lung therapy*” w którym, w oparciu o liczne doniesienia, znajdujemy uzasadnienie badań nad syntetycznymi polimerami kationowymi jako najbardziej obiecującymi nanośnikami dla siRNA. W kolejnych trzech oryginalnych publikacjach przedstawiono opis wyników związanych z realizacją zaplanowanych zadań badawczych.

Celem badań przedstawionych w pracy „*Unmodified and tyrosine-modified polyethylenimines as potential carriers for siRNA: biophysical characterization and toxicity*” była charakterystyka właściwości biofizycznych i biologicznych polimerów polietylenoiminowych (PEI) oraz ich odpowiedników modyfikowanych tyroziną (łącznie 16 związków). Wykorzystując szerokie spektrum technik i modeli badawczych potwierdzono obiecujące właściwości PEI modyfikowanych tyroziną, stąd dalsze badania, podsumowane w dwóch kolejnych artykułach, prowadzono już tylko dla tej grupy związków. Z kolei w publikacji zatytułowanej „*Comparison of tyrosine-modified low molecular weight branched and linear polyethylenimines for siRNA delivery*” skupiono się na głębszym poznaniu właściwości biofizycznych kompleksów siRNA/polimer oraz ich skuteczności *in vitro* i *ex vivo*. Zbadano kompleksowanie siRNA, właściwości biofizyczne kompleksu, toksyczność i skuteczność eliminacji genów. Natomiast w ostatniej publikacji, zgodnie z podanym tytułem: „*The effect of novel tyrosine-modified polyethyleneimines on human albumin structure—thermodynamic and spectroscopic study*” wnikliwie sprawdzono i przeanalizowano interakcję polimerów modyfikowanych tyroziną z albuminą ludzką.

Po dokładnej lekturze wszystkich publikacji stwierdzam, że cel pracy doktorskiej został zrealizowany, a przyjęte założenia badawcze zweryfikowano i wyjaśniono. Wykazano, że modyfikacja tyroziną zmieniła właściwości PEI, ułatwiła interakcję z błonami, zmniejszyła cytotoksyczność oraz genotoksyczność PEI. Liniowe i rozgałęzione polimery modyfikowane tyroziną kompleksowały siRNA w korzystnych stosunkach masowych, co pozwoliło na znaczące



obniżenie ekspresji genów przy ograniczonej cytotoxycywności. Stwierdzono, że PEI modyfikowane tyrozyną tworzą stabilne kompleksy z siRNA o niskim potencjale indukcji apoptozy i stresu oksydacyjnego, nie uszkadzają błony komórkowej i mitochondrialnej. Spośród szeregu przebadanych kompleksów wyodrębniono jeden (LP 10Y) o najbardziej obiecujących właściwościach w dostarczaniu siRNA do komórek. Dodatkowo, wykazano interakcję polimerów modyfikowanych tyrozyną z albuminą surowicy ludzkiej, co może wpływać na ich toksycywność, biodystrybucję oraz aktywność biologiczną *in vivo*. Podkreślę raz jeszcze, iż przedstawione badania są starannie zaprojektowane i przemyślane. Obraz całości wyraźnie wskazuje na zdolność mgr Małgorzaty Kubczak do twórczej pracy naukowej.

Czytając pracę doktorską nasunęło mi się kilka pytań, uprzejmie proszę Doktorantkę o odpowiedź na intrygujące mnie kwestie:

- W badaniach opisanych w artykule „*Unmodified and tyrosine-modified polyethylenimines as potential carriers for siRNA: biophysical characterization and toxicity*” zapisano wzór (pp. 3), na podstawie którego wyznaczono wartości anizotropii. Wzór ten różni się od zwykle podawanego w literaturze, gdzie mianownik wynosi:  $(I_{VV}+2GI_{VH})$ . Proszę o odniesienie się do tej różnicy i wyjaśnienie z czego ona wynika.
- Czy sprawdzono wpływ PEI na intensywność fluorescencji (widmo emisyjne) sond DPH i TMA DPH?
- Analizując zmiany płynności błony modelowej uformowanej z DMPC i DPPG, w metodologii formowania liposomów podano, że „*lipid film was watered with PBS*” Czy zamiast słowa „*watered*” nie powinno być użyte słowo „*hydrated*” (powszechnie używane w literaturze)?
- Autorzy podają, że „*after extrusion, the liposome suspension was stored at 4 °C and used for experiments within 1 week after preparation*”. Kiedy dokładnie dodawano znaczniki fluorescencyjne? Jaki był czas inkubacji liposomów z sondą?
- Czy sprawdzono rozmiar i stabilność liposomów? Wykorzystując technikę DLS można również sprawdzić rozmiar i potencjał liposomów modyfikowanych PEI, co wniosłoby dodatkowe informacje na temat interakcji badanych związków z błoną.



- Interakcje między polimerami i hydrofobowymi częściami albuminy analizowano przy użyciu kwasu 1-anilino-naftaleno-8-sulfonowego (ANS). ANS rozpuszczono w DMSO. Czy sprawdzono intensywność fluorescencji HSA z samym DMSO dodanym do buforu?
- Autorka napisała, iż „*dla lepszego zrozumienia interakcji polimerów modyfikowanych tyrozyną z innymi składnikami osocza ludzkiego należy przeprowadzić bardziej zaawansowane badania*”. Proszę o podanie przykładu takich badań.
- Doktorantka stwierdza, że opisane właściwości PEI „*wskazują, że kompleksy polimerów modyfikowanych tyrozyną mogą być skuteczne w bardziej zaawansowanych modelach eksperymentalnych*”. Jakie mogły by to być modele?

Drobne uwagi, nie wymagające komentarza/odpowiedzi Doktorantki:

- Szkoda, że Autorka nie zamieściła struktur chemicznych badanych cząsteczek, oczywiście jest podany odnośnik do źródłowej publikacji, w której przedstawiono budowę i określono właściwości fizykochemiczne zmodyfikowanych związków.
- W spisie dorobku podane są projekty, w których doktorantka brała udział. Data zakończenia projektu NCN BEETHOVEN LIFE jest prawdopodobnie błędnie zapisana, zapewne będzie to 30.11. 2023 roku, a nie 30.11.2013 roku.

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kubczak jest opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Wyniki badań są wartościowe ze względu na ich aspekt poznawczy (ocena właściwości biofizycznych i biologicznych polimerowych nanocząstek) oraz mają znaczenie aplikacyjne w projektowaniu i doskonaleniu nanocząstek jako potencjalnych wydajnych transporterów leków. Doktorantka zna bardzo dobrze nowoczesny warsztat badawczy, rozumie metodologię i zasady planowania badań naukowych oraz posiada umiejętność krytycznej analizy uzyskanych rezultatów i prowadzenia dyskusji. Biorąc pod uwagę przedstawioną rozprawę doktorską, jak również doświadczenie naukowe Pani Małgorzaty Kubczak mogę stwierdzić, że Autorka jest przygotowana do samodzielnej pracy naukowej w zakresie biofizyki, biologii i biochemii.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Małgorzaty Kubczak spełnia kryteria Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce stawiane pracom



doktorskim. Zwracam się zatem uprzejmie do Komisji do spraw Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Na koniec, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny pracy doktorskiej, wysoki poziom prezentowanych badań, bardzo ważną dziedzinę badań oraz sukcesy publikacyjne, zwracam się z uprzejmą prośbą do Komisji o przyznanie rozprawie stosownego wyróżnienia.

Hanna Pruchnik, 03 września 2023

