



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 23 września 2023 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kubczak
pt. „Properties and application of tyrosine-modified and unmodified
polyethyleneimine polymers as siRNA carriers”**

Potencjalne możliwości dostarczania kwasów nukleinowych do komórek rozbudziło nasze oczekiwania oraz nadzieję wielu chorych cierpiących na choroby genetyczne. Okazuje się jednak, iż ta pozornie prosta idea napotyka przy praktycznej realizacji na szereg problemów czyniących te procedury medyczne niezwykle trudnymi. Wśród problemów tych dostrzega się brak odpowiednich nośników umożliwiających przenoszenie RNA do wnętrza komórki, przy zachowaniu integralności oraz wysokiej stabilności materiału genetycznego. Dobór właściwych nośników wiąże się, przede wszystkim z ograniczeniem ich cytotoksyczności w stosunku do komórek pacjentów. Pomimo wieloletnich prób rozwiązania tego typu problemów stanowią one wciąż aktualne wyzwanie poznawcze stawiane przed środowiskiem naukowym. Zadania badawcze realizowane w ramach projektu

doktorskiego pani mgr Małgorzaty Kubczak wpisują się w ten właśnie obszar międzynarodowej aktywności naukowej, czyniąc tę pracę nie tylko interesującą z poznawczego punktu widzenia, ale również bardzo ważną i aktualną.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki Ogólnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, pod kolektywnym kierunkiem profesorów Maksima Ionova oraz Achima Aingera z Uniwersytetu w Lipsku w Niemczech. Rozprawa doktorska opiera się na wynikach prac koncepcyjnych oraz eksperymentalnych zamieszczonych w czterech artykułach opublikowanych w latach 2021-2023. We wszystkich tych pracach Doktorantka występuje na liście autorów na pierwszej pozycji, zaś z analizy tekstu rozprawy oraz dołączonych do pracy doktorskiej oświadczeń współautorów wynika jednoznacznie, iż wkład pani mgr Małgorzaty Kubczak w uzyskane rezultaty był zasadniczy i może stanowić podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Kandydatka również doskonaliła swój warsztat naukowy w innych komplementarnych projektach badawczych, których wyniki opublikowane zostały w kolejnych jedenastu artykułach. Przedruki prac, które są podstawą rozprawy doktorskiej stanowią jej integralną część. Kopie artykułów poprzedzone zostały częścią wstępną, zredagowaną w języku angielskim, w oparciu o przejrzysty i logiczny schemat opierający się na następującej podstrukturze: wprowadzenie, cele pracy, materiały, metody, rezultaty, konkluzje, streszczenia (zredagowane w języku angielskim i polskim) oraz piśmiennictwo. Funkcję wprowadzenia zainteresowanego czytelnika do tematyki zastosowania nanocząstek, w tym liniowych i rozgałęzionych polimerów, jako nośników materiału genetycznego do komórek, w szczególności siRNA pełni doskonale pierwszy w zestawieniu artykuł, będący świetnie zredagowaną oraz opatrzoną pomysłowymi grafikami pracą przeglądową. Praca ta ukazała się w renomowanym czasopiśmie *Advanced Drug Delivery Reviews*. Syntetycznym odzwierciedleniem wartości tej publikacji jest podrozdział rozprawy pt. „Introduction”. Cele projektu doktorskiego, zarówno te strategiczne jak i cząstkowe, sformułowane zostały w ramach krótkiego podrozdziału „The aim of the work”. Z treści tego rozdziału dowiadujemy się, że projekt doktorski pani mgr Małgorzaty Kubczak opiera się na

nośnej hipotezie badawczej. W moim odczuciu, podnosi to znacząco wartość pracy doktorskiej. W ramach podrozdziału „Materials” zestawione zostały podstawowe informacje dotyczące materiałów oraz komórek wykorzystywanych w przeprowadzonych badaniach. W szczególności, czytelnik uzyskuje informację dotyczącą bogatej biblioteki wykorzystanych polimerów polietylenoiminowych (PEI), liniowych oraz rozgałęzionych, modyfikowanych oraz niemodyfikowanych tyrozyną. Polimery te, syntezowane w laboratorium prof. Achima Aignera, stanowiły doskonały punkt wyjściowy do zaawansowanych prac badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego. Prace te prowadzone były w trzech obszarach badawczych. Pierwszy z nich dotyczył charakterystyki właściwości fizykochemicznych samych polimerów oraz kompleksowania z siRNA. Wśród zasadniczych pytań natury poznawczej, na które poszukiwano odpowiedzi w ramach pierwszego obszaru tematycznego znalazły się również te dotyczące cytotoksyczności badanych nośników. W ramach drugiego obszaru badawczego podjęto starania ukierunkowane na poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za stabilizację kompleksów PEI-siRNA, ich toksyczności oraz odpowiedzialnych za efekt wyciszenia ekspresji genów. W ramach trzeciej grupy tematycznej, aktywność badawcza zogniskowana została, przede wszystkim, na poznaniu mechanizmów oddziaływania polimerowych nośników siRNA (modyfikowanych tyrozyną) z podstawowym białkiem transportowym krwi, jakim jest albumina ludzka. W tym miejscu swojej analizy pracy doktorskiej chciałbym zwrócić uwagę na wyjątkowo bogaty arsenał technik eksperymentalnych dobieranych selektywnie i adekwatnie, z uwzględnieniem natury problemów badawczych stanowiących wyzwania poznawcze. W gronie tych nowoczesnych oraz zaawansowanych metod badawczych wymienić można: badania rozmiarów nanocząstek w oparciu o analizę rozpraszania światła oraz mikroskopię elektronową, metody spektroskopii molekularnej opierające się na pomiarach dichroizmu kołowego oraz sygnału fluorescencji, obrazowanie konfokalne w skali submikroskopowej oraz techniki genetyki i biologii molekularnej jak cytometria przepływowa czy PCR. Szczegóły wszystkich procedur badawczych opisane zostały

w ramach odpowiednich części metodycznych poszczególnych artykułów stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Ich poziom precyzji, w mojej ocenie odpowiada w pełni standardom umożliwiającym odtworzenie przeprowadzonych badań. Uzyskane rezultaty, opisane skrótowo w ramach podrozdziału „Results” oraz szczegółowo w artykułach nr 2, 3 oraz 4, wpisują się bardzo dobrze w założone cele pracy doktorskiej. W pełni zgadzam się z Doktorantką w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć projektu doktorskiego, wyartykułowanych w ramach podrozdziału „Conclusions”. Z mojego punktu widzenia, szczególnie istotne w aspekcie poznawczym oraz aplikacyjnym jest pokazanie, że modyfikacja polimerów PEI tyroziną nie tylko ułatwia internalizację kompleksów PEI-siRNA do komórek ludzkich, zwiększa ich stabilność i odporność na degradację enzymatyczną, ale również minimalizuje potencjalną cytotoksyczność tego obiecującego w aspekcie terapii genowej nośnika.

Analizowana rozprawa doktorska jest również w mojej ocenie opracowaniem charakteryzującym się znacznymi walorami formalnymi, w tym zwięzłością i precyzją sformułowań oraz przejrzystością szaty graficznej. W oparciu o lekturę rozprawy, mógłbym zaproponować Doktorantce dosłownie pojedyncze korekty/modyfikacje. Oto ich krótka lista:

1. Str. 12., 9. wiersz od góry: zamiast „luminescent measurements” proponuję „luminescence measurements”;
2. Str. 13., 13. wiersz od dołu: w miejsce „Tyrosine modification” proponuję „Tyrosine modifications”;
3. Praca zamieszczona jako ostatnia, Figures 2, 4, S1, S2, S3, S4, oraz w innych przedstawiających widma fluorescencyjne brak jest jednostek w opisie osi rzędnych, proponuję na przykład [a.u.] albo [r.u.];
4. W ramach pracy zamieszczonej jako ostatnia, Fig. 2, Fig. 4, S1, S2, S3, S4 oraz w kilku innych miejscach (praca zamieszczona jako przedostatnia)

proponuję w przyszłości zamienić opis osi odciętych: „Wavelength” zamiast „Wavelenght” (przestawione t oraz h).

Tak obszerne i wieloaspektowe opracowanie, jakim jest rozprawa doktorska pani mgr Małgorzaty Kubczak, wnosi wiele cennych informacji, rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego może być, na przykład, następujące pytanie:

Analizy średnicy hydrodynamicznej, obrazów mikroskopii elektronowej oraz spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) potwierdziły formowanie kompleksów polimerów PEI modyfikowanych tyrozyną z albuminą ludzką. Spodziewać się można, iż przy badaniach sygnału CD białka oraz nośników zawierających skompleksowany siRNA widma mogłyby się częściowo przykrywać, wnosząc niepewność pomiarową. Wynika to, na przykład, z porównania widm przedstawionych w pracy opublikowanej w *Nanotoxicology* (Fig. 3) z przedstawianymi w ramach Fig. 4 pracy opublikowanej w *Colloids and Surfaces: Biointerfaces*. Ciekaw jestem czy zastosowanie spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (FTIR) mogłoby przynieść bardziej szczegółowe, a zarazem pewne informacje na temat mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za wiązanie polimerów wiążących siRNA z cząsteczkami białka?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Małgorzata Kubczak przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach oryginalnych prac koncepcyjnych oraz badawczych ogłoszonych w cyklu artykułów opublikowanych w czasopiśmie o międzynarodowej cyrkulacji. W świetle efektów tej aktywności Kandydatka jawi się jako osoba doskonale przygotowana do prowadzenia

badania naukowych, zarówno w aspekcie wiedzy jak i umiejętności praktycznych umożliwiających stosowanie licznych, zaawansowanych technik eksperymentalnych.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Małgorzatę Kubczak rozprawa doktorska zawiera rozwiązania ważnych oraz aktualnych problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w Ustawie „Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce” z dnia 20 lipca 2018 r. W związku z powyższym, wnoszę do Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Kubczak do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Uwzględniając wyjątkowo szeroki zakres przeprowadzonych prac badawczych przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, wartość poznawczą uzyskanych wyników oraz ich potencjał aplikacyjny wnoszę również o rozważenie możliwości uznania pracy doktorskiej pani mgr Małgorzaty Kubczak jako wyróżniającej.

