

Uniwersytet Rzeszowski Al. Rejtana 16 C, 35-959 Rzeszów		Instytut Nauk Medycznych Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytet Rzeszowski
---	---	--

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Wydział Medyczny
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 23.03.2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mariki Grodzickiej pt. „Charakterystyka biofizyczna i ocena właściwości biologicznych polifenolowych dendrymerów modyfikowanych kwasem kawowym”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Mariki Grodzickiej została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Maksima Ionova pełniącego rolę promotora oraz dr hab. Sylwii Michlewskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego. Praca została wykonana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały współfinansowane ze środków pięciu grantów: trzech grantów z NCN i dwóch grantów z NAWA.

Ocena formalna i metodologiczna pracy

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Mariki Grodzickiej stanowi zbiór czterech oryginalnych powiązanych tematycznie artykułów naukowych wysoko punktowanych o zasięgu międzynarodowym opublikowanych w latach 2022-2024 w prestiżowych czasopismach. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są opracowaniami zbiorowymi, w których Pani mgr Marika Grodzicka jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 21,1, a punktacja MEiN wynosi 540 pkt.

W rozprawie doktorskiej zawarto także pozostały dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się pięć publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz cztery komunikaty zjazdowe. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) całego dorobku publikacyjnego łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej wynosi 41,592, punktacja MEiN wynosi 1030 pkt., indeks H-index (na podstawie bazy Web of Science) wynosi 2, a liczba cytowani wynosi 18. Ponadto Doktorantka uczestniczyła w realizacji sześciu projektów

naukowych, a w latach 2021-2023 odbyła cztery krótkoterminowe staże naukowe – dwa krajowe i dwa zagraniczne. Doktorantka posiada również dorobek w zakresie działalności organizacyjnej i promocyjnej. Całkowity dorobek naukowy Pani mgr Mariki Grodzickiej jest imponujący biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

W rozprawie doktorskiej zawarto również oświadczenia współautorów artykułów wchodzących w skład doktoratu, które jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę Doktorantki w realizacji prac badawczych. Udział Doktorantki we wszystkich przedstawionych pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest wysoki. Wkład pracy mgr Mariki Grodzickiej został określony w każdej z prac w zakresie od 53% do 64%. Tak duży udział Doktorantki stanowi niezaprzeczalnie podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora na podstawie przedstawionego cyklu prac. Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają wysoką wartość merytoryczną i metodyczną.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu zawierającego następujące rozdziały: wykaz skrótów, wprowadzenie, cel pracy, hipoteza badawcza, materiały i metody, omówienie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wnioski, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, bibliografia, dorobek naukowy, spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, spis pozostałych publikacji oraz działalność naukowa tj. komunikaty zjazdowe, udział w projektach, działalność organizacyjna i promocyjna, pełnione funkcje, staże naukowe, nagrody i wyróżnienia. Ponadto w pracy załączono publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W pracy podano również źródła finansowania i wymieniono instytucje naukowe krajowe i zagraniczne, z którymi prowadzono współpracę w ramach realizacji pracy doktorskiej.

Rozdział Wprowadzenie stanowi ogólną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. W rozdziale tym w skrócie przedstawiono podstawowe informacje dotyczące zastosowania dendrymerów jako nośników leków i kwasów nukleinowych w terapii różnych chorób oraz wpływ koniugatów takich jak glikol polietylenowy (PEG) i kwas kawowy (CA) na właściwości biomedyczne dendrymerów.

W pracy doktorskiej postawiono hipotezę stanowiącą, że polifenolowe dendrymery karbokrzemowe pierwszej generacji wykazują potencjał przeciwutleniający, chronią komórki przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego, wchodzą w interakcję z albuminą ludzką i błonami biologicznymi, a także tworzą kompleksy z terapeutycznymi siRNA i przenoszą je do komórek. W następnym rozdziale prawidłowo sformułowano cele pracy. W kolejnym rozdziale wyszczególniono zastosowane materiały i metody badawcze. W pracy oceniono właściwości

syntetyzowanych polifenolowych dendrymerów karbokrzemowych pierwszej generacji zawierających w swojej strukturze kwas kawowy dołączony do dendrymerów bezpośrednio lub za pośrednictwem PEG. Właściwości i charakterystykę nowo-syntetyzowanych dendrymerów oceniono poprzez zastosowanie fibroblastów ludzkich, linii komórkowej niedrobnokomórkowego raka płuca (A549), erytrocytów i błon erytrocytarnych izolowanych z kożucha leukocytno-płytkowego zdrowych dawców, liposomów oraz albuminy ludzkiej. W pracy wykorzystano adekwatne metody badawcze pozwalające na osiągnięcie celu projektu. Do metod badawczych, które zostały użyte w ramach realizacji pracy należą: laserowa elektroforeza dopplera (LDE), technika dynamicznego rozpraszania światła (DLS), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), spektroskopia fluorescencyjna, dichroizm kołowy (CD), elektroforeza w żelu agarozowym, mikroskopia konfokalna, cytometria przepływowa, a także testy *in vitro*. W kolejnych rozdziałach Doktorantka sprawozdaje uzyskane wyniki badań i formułuje wnioski w czterech punktach.

Do pracy załączono kopie czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Czasopisma naukowe w których zostały opublikowane artykuły mają wysoki współczynnik oddziaływania, co potwierdza wysoką wartość poznawczą i wysoki poziom naukowy przedstawionej pracy doktorskiej. W załączonych pracach nie znajduję błędów merytorycznych, metodologicznych czy edytorskich.

Podsumowując, zaprezentowana praca doktorska z załączonym cyklem publikacji posiada wysoką wartość merytoryczną i metodyczną, co jest właściwe dla przeprowadzenia postępowania doktorskiego.

Ocena merytoryczna pracy

Poprawność formułowania hipotez i założeń badawczych

Doktorantka precyzuje założenia i cele pracy w prawidłowy sposób. Podstawowym celem pracy była biofizyczna charakterystyka polifenolowych dendrymerów karbokrzemowych pierwszej generacji zawierających w swojej strukturze kwas kawowy (CA) i glikol polietylenowy (PEG). Dodatkowym celem była ocena właściwości biologicznych dendrymerów takich jak aktywność przeciwutleniająca, cytotoksyczność, charakter oddziaływania z błonami biologicznymi i białkiem osocza oraz analiza możliwości zastosowania tych dendrymerów jako nośników terapeutycznego siRNA. Cele pracy osiągnięto poprzez realizację następujących zadań badawczych: 1. Charakterystyka biofizyczna polifenolowych dendrymerów karbokrzemowych oraz analiza ich cytotoksyczności i właściwości przeciwutleniających; 2. Analiza oddziaływań dendrymerów z albuminą ludzką oraz błonami biologicznymi; 3. Ocena zdolności dendrymerów do tworzenia kompleksów z terapeutycznymi siRNA i przenoszenia

ich do komórek; 4. Ocena skuteczności działania powstałych kompleksów dendrymer/siRNA w warunkach *in vitro*.

Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Cele badawcze pracy zostały w pełni zrealizowane z zastosowaniem szeregu metod badawczych. Dane biologiczno-doświadczalne zostały starannie opisane we wszystkich oryginalnych publikacjach. Sformułowane wnioski są jednoznaczną odpowiedzią na przedstawione cele pracy. Piśmiennictwo w załączonych publikacjach jest właściwie dobrane i jest bezpośrednio związane z tematyką pracy.

Trafność doboru metod oraz poprawność opisu uzyskanych wyników i sformułowania wniosków

W pracy doktorskiej w sposób prawidłowy dobrano metody badawcze oraz prawidłowo opisano uzyskane wyniki i sformułowano wnioski. W publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zastosowane metody i uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane. W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. „Heterofunctionalized polyphenolic dendrimers decorated with caffeic acid: Synthesis, characterization and antioxidant activity” opublikowanej w Sustainable Materials and Technologies w 2022 roku przeprowadzono syntezę karbokrzemowych dendrymerów polifenolowych wzbogaconych o jedną lub dwie cząsteczki kwasu kawowego dołączonego do dendrymeru bezpośrednio lub za pośrednictwem glikolu polietylenowego. Następnie scharakteryzowano dendrymery pod względem właściwości biofizycznych oraz oceniono ich cytotoksyczność. Dendrymery nie zawierające PEG charakteryzowały się wyższym potencjałem zeta niż dendrymery z PEG. Za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazano, że dendrymery z PEG mają większy rozmiar niż dendrymery niezawierające PEG. Ponadto badane dendrymery wykazywały niską cytotoksyczność zarówno wobec fibroblastów, jak i komórek raka płuca (A549) oraz chroniły erytrocyty przed hemolizą oksydacyjną. Co więcej, dendrymery wykazywały większy efekt ochronny przed uszkodzeniami spowodowanymi stresem oksydacyjnym niż klasyczne przeciwutleniacze. Wykazano, że dendrymer z dwiema cząsteczkami kwasu kawowego i PEG charakteryzował się najlepszą aktywnością antyoksydacyjną.

W drugiej pracy pt. „A new class of polyphenolic carbosilane dendrimers binds human serum albumin in a structure-dependent fashion” opublikowanej w Scientific Report w 2024 roku scharakteryzowano interakcje badanych dendrymerów z białkami surowicy. W niniejszej pracy wykazano, że obecność dendrymerów w roztworze albuminy spowodowała zwiększenie rozmiaru obserwowanych cząsteczek. Analiza widm dichroizmu kołowego wykazała, że

struktura ludzkiej albuminy została zmieniona nieznacznie w obecności dendrymerów. Otrzymane w tej pracy wyniki wskazują że, dendrymery polifenolowe oddziałują z albuminą surowicy ludzkiej, nieznacznie wpływając na strukturę drugorzędową tego białka.

W trzeciej pracy pt: „Effect of polyphenolic dendrimers on biological and artificial lipid membranes” opublikowanej w Chemistry and Physics of Lipids opublikowanej w 2024 roku, określono mechanizmy interakcji badanych dendrymerów z błonami lipidowymi. W pracy tej do analizy interakcji pomiędzy dendrymerami a liposomami wykorzystano techniki TEM, LDE oraz DLS. Wykazano, że dendrymery zawierające jedną resztę kwasu kawowego nieznacznie zmieniły średnicę hydrodynamiczną liposomów. Natomiast obecność dendrymerów z dwiema resztami kwasu kawowego spowodowała istotny wzrost wielkości nanokompleksów. Ponadto stosując technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej pokazano, że liposomy skompleksowane z dendrymerami miały zmieniony kształt i strukturę. Dodatkowo, obecność dendrymerów powodowała zmianę ładunku powierzchniowego liposomów z ujemnego na dodatni. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na elektrostatyczny charakter interakcji między badanymi składnikami. Następnie w pracy tej do analizy zmian płynności błon spowodowanych obecnością dendrymerów zastosowano technikę fluorymetryczną z wykorzystaniem znaczników fluorescencyjnych DPH i TMA-DPH. Dodanie dendrymerów do zawiesiny błon zawierających sondy fluorescencyjne spowodowało wzrost rejestrowanej anizotropii fluorescencji, co wskazuje na zmniejszenie płynności błony zarówno w regionie hydrofilowym, jak i hydrofobowym.

W czwartej pracy pt: „Polyphenolic dendrimers as carriers of anticancer siRNA” opublikowana w The International Journal of Pharmaceutics w 2024 roku oceniono zdolności dendrymerów polifenolowych do tworzenia kompleksów z proapoptotycznymi siRNA (siMcl-1 i siBcl-2) oraz zbadano efektywność przeciwnowotworowego działania kompleksów dendrymer/siRNA w stosunku do komórek A549 niedrobnokomórkowego raka płuca. W pracy pokazano, że wszystkie testowane dendrymery tworzyły kompleksy z siRNA, oraz chroniły go przed degradacją w obecności nukleaz. Wykazano również, że kompleksy zawierające dendrymery z PEG były bardziej stabilne niż dendrymery bez PEG. Ponadto kompleksy dendrymer/siRNA nie wykazały cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów, natomiast zaobserwowano spadek żywotności komórek nowotworowych. Dodatkowo, za pomocą cytometrii przepływowej i mikroskopii konfokalnej wykazano, że wszystkie badane dendrymery skutecznie wprowadzały siRNA do komórek nowotworowych. Do kolejnych ważnych obserwacji należą: zmniejszenie adhezji i hamowanie procesu migracji komórek nowotworowych przy zastosowaniu wszystkich testowanych kompleksów utworzonych z siMcl-1. W celu sprawdzenia, czy kompleksy dendrymerów z proapoptotycznym siRNA indukują apoptozę zastosowano test podwójnego barwienia i analizowano poszczególne

frakcje komórek techniką cytometrii przepływowej. Wykazano, że 72-godzinna inkubacja komórek A549 z utworzonymi kompleksami przyczyniła się do zwiększenia frakcji komórek apoptotycznych. Otrzymane w tej pracy wyniki wskazują że, dendrymery polifenolowe skutecznie dostarczają siRNA do komórek nowotworowych A549 i kierują je na drogę apoptozy.

W tym miejscu należy zauważyć, że w pracy zabrakło wyjaśnienia dlaczego do analiz efektywność przeciwnowotworowego działania kompleksów badanych dendrymerów z siMcl-1 i siBcl-2 wykorzystano komórki A549 niedrobnokomórkowego raka płuca.

W tym miejscu nasuwa mi się również pytanie do Doktorantki:

Czy Doktorantka posiada informacje dotyczące zaburzeń ekspresji genów *Mcl-1* i *Bcl-2* w linii komórkowej A549?

W czterech załączonych publikacjach oryginalnych dyskusja została napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe wskazujące, że:

1. Karbokrzemowe dendrymery polifenolowe pierwszej generacji wykazują niską cytotoksyczność, a modyfikacja kwasem kawowym czyni je skutecznymi przeciwutleniaczami;
2. Dendrymery polifenolowe oddziałują z albuminą surowicy ludzkiej oraz błonami lipidowymi;
3. Dendrymery polifenolowe tworzą stabilne kompleksy z proapoptotycznymi siRNA (siMcl-1 i siBcl-2) oraz chronią je przed degradacją w obecności nukleaz;
4. Proapoptotyczne siRNA wprowadzone do komórek nowotworowych linii A549 z wykorzystaniem dendrymerów polifenolowych indukuje apoptozę.

Doktorantka potwierdziła zatem, że istnieje możliwości zastosowania dendrymerów polifenolowych jako nośników terapeutycznego siRNA. Ten aspekt pracy stanowi element nowości i oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Jednakże potwierdzenie takich możliwości wymaga przeprowadzenia dalszych badań *in vitro* z zastosowaniem innych linii komórek nowotworowych oraz w dalszej kolejności badań *in vivo*.

Trafność problematyki badawczej i jej oryginalność

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle istotny dla rozwoju nowych terapeutyków opartych na dendrymerach jako nośników leków i kwasów nukleinowych

zwiększających skuteczność terapii przeciwnowotworowej. W ostatnich latach rozwijanych jest coraz więcej terapii przeciw-nowotworowych opartych na cząsteczkach siRNA. Jednakże, problem nadal stanowi zastosowanie nośników siRNA, które będą cechowały się odpowiednią biodostępnością, niską toksycznością i wysokim profilem transfekcji. Strategia zastosowana w pracy doktorskiej opiera się na niezwykle interesującym i nowatorskim podejściu polegającym na zastosowaniu polifenolowych dendrymerów zawierających kwas kawowy i PEG do przenoszenia proapoptotycznego siRNA do komórek A549 niedrobnokomórkowego raka płuca. W ramach realizacji pracy doktorskiej wykazano, że dendrymery tworzyły stabilne kompleksy z siRNA i chroniły kwasy nukleinowe przed degradacją w obecności nukleaz. Ponadto wykazano, że wszystkie badane dendrypleksy hamowały migrację i adhezję komórek nowotworowych oraz zwiększały populację komórek wczesno-apoptotycznych. Wykazano, że dendrymer zawierający dwie reszty kwasu kawowego miał najlepszy profil transfekcji. Dlatego, wydaje się być on obiecującym kandydatem do dostarczania siRNA do komórek nowotworowych.

W związku z powyższym temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i szczególnie istotny dla opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem polifenolowych dendrymerów jako nośników drobnocząsteczkowych RNA.

Znaczenie uzyskanych wyników dla nauki i praktyki

Uzyskane w ramach realizacji wyniki stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą opracowania terapii przeciwnowotworowej opartej na zastosowaniu polifenolowych dendrymerów jako nośników leków. Uzyskane w pracy wyniki są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, ponieważ otwierają możliwości praktycznego ich zastosowania w celu opracowania skuteczniejszych i nowych terapii przeciwnowotworowych.

Wnioski końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogromną wiedzę teoretyczną Doktorantki we wskazanej dyscyplinie naukowej oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka biofizyczna i ocena właściwości biologicznych polifenolowych dendrymerów modyfikowanych kwasem kawowym” w pełni spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Mariki Grodzickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik