



**WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, dn. 10 maja 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Szuster

pt. *„Wpływ dendrymerów PAMAM oraz ich biokoniugatów z biotyną i pirydoksałem
na właściwości biologiczne różnych typów komórek in vitro”*

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Wałajtys-Rode

i dr Łukasza Urama

na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Szuster dotyczy porównania wpływu niemodyfikowanych dendrymerów poliamidoaminowych (PAMAM) generacji trzeciej oraz dendrymerów PAMAM o powierzchni zmodyfikowanej biotyną i pirydoksałem na trzy rodzaje linii komórkowych ludzkiej skóry: prawidłowych fibroblastów (BJ), unieśmiertnionych keratynocytów (HaCaT) oraz komórek raka płaskonabłonkowego (SCC-15).

Praca ma typowy dla dysertacji doktorskich układ. Składa się z wykazu najczęściej stosowanych skrótów, wstępu teoretycznego, opisu celu badań i zastosowanych materiałów i metod, przedstawienia wyników, dyskusji, podsumowania, wniosków, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim oraz wykazu dorobku naukowego.

Wstęp teoretyczny zajmuje prawie połowę pracy (gdy nie uwzględnia się spisu literatury), co sprawia, że jest on, moim zdaniem, zbyt obszerny. Wstęp obejmuje zagadnienia związane z dendrymerami, witaminami z grupy B, budową i funkcją skóry oraz wpływem nanomateriałów na układ immunologiczny. W moim odczuciu

najciekawiej napisany fragment części teoretycznej pracy dotyczy mechanizmu wnikania dendrymerów do komórek.

W opisie **celu badań** pojawia się zarówno stwierdzenie, że „*celem pracy było zbadanie wpływu przyłączenia witamin z grupy B (...) na szereg właściwości biologicznych trzech linii komórkowych ludzkiej skóry*”, jak i bardziej ogólny powód badań, tj. że wyniki uzyskane w pracy „*mogą pozwolić na skonstruowanie bezpiecznych, wielofunkcyjnych nośników do pielęgnacji i terapii chorób skóry*”. Czy zatem celem Doktorantki było użycie dendrymerów PAMAM jako nośników witamin z grupy B i jakie przesłanki stoją za poszukiwaniem takich nośników?

W części zatytułowanej **Materiały i metody** Doktorantka napisała, że korzystała w swojej pracy z dendrymeru PAMAM generacji trzeciej i jego biokoniugatu - syntezowanych przez dwa zespoły chemików: Pana prof. dr hab. inż. Stanisława Wołowca z Uniwersytetu Rzeszowskiego i Pani dr Aleksandry Filipowicz z Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie. Jeśli Doktorantka nie brała udziału w syntezie tych związków, zamieszczanie w pracy doktorskiej procedury uzyskiwania dendrymerów wydaje się zbędne (Rozdziały 3.1-3.3). Natomiast bez wątpienia pomocnym było pokazanie budowy chemicznej biokoniugatu (na ryc. 22). Z opisu metod trudno wywnioskować, czy znakowanie dendrymerów izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) zostało wykonane przez Doktorantkę, czy również w zespole chemików. W pracy znajduje się informacja, że każda cząsteczka dendrymeru była wyznakowana jedną cząsteczką izotiocyanianu fluoresceiny, nie zostało jednak wyjaśnione, w jaki sposób to weryfikowano oraz w jaki sposób sprawdzono, czy uzyskany produkt nie zawierał wolnego, niezwiązanego z dendrymerem FITC.

Opis biologicznej części doświadczeń jest bardzo poprawny i na tyle szczegółowy, że pozwala odtworzyć wykonane doświadczenia. Zastanawiające jest dlaczego przeprowadzając test z czerwienią obojętną dodawano różne objętości czerwieni obojętnej i stosowano różne czasy inkubacji dla różnych linii komórkowych i dlaczego zastosowano różne czasy inkubacji komórek poszczególnych linii komórkowych z XTT.

W pracy zastosowano metodę oceny migracji komórek testem gojenia ran. Obserwacji mikroskopowych obszarów rys dokonywano po różnych czasach inkubacji z dendrymerami w zależności od badanej linii komórkowej (od 7 godzin dla komórek linii BJ do 24 godzin dla komórek SCC-15) – z czego wynikały te różnice?

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę obejmują ocenę cytotoksyczności dendrymerów (dwoma testami: z czerwienią obojętną i z solami tetrazolowymi XTT), ocenę indukcji apoptozy, ocenę szybkości migracji komórek testem gojenia ran, oznaczenie akumulacji dendrymerów w komórkach i ich lokalizacji w jądrach komórkowych i mitochondriach. Powyższe metody zostały zastosowane dla trzech badanych linii komórkowych. Niejako osobną częścią pracy była ocena wpływu dendrymeru PAMAM i jego koniugatu

z witaminami z grupy B na produkcję cytokin prozapalnych: interleukiny-1 α (IL-1 α) i TNF- α w komórkach keratynocytów po stymulacji lipopolisacharydem (LPS), estrami forbolu (PMA) i białkiem bakteryjnym GroEL.

Dobór linii komórkowych w pierwszej części badań, aczkolwiek interesujący z punktu widzenia celu postawionego w rozprawie, może nastręczać trudności w interpretacji wyników ze względu na znacząco różny czas podwojenia komórek (dla linii BJ, SCC-15 i HaCaT wynosi on odpowiednio: 1,9 doby, 5,5 doby oraz 1 dobę). Czy zdaniem Doktorantki fakt ten mógł mieć wpływ na obserwowane różnice w profilach cytotoksyczności dla poszczególnych linii komórkowych?

W **Dyskusji** Doktorantka konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi. Ta część pracy jest dla Doktorantki okazją do wykazania się znajomością bardzo szerokiej literatury.

Trudno jest zgodzić się ze stwierdzeniem w pierwszym akapicie dyskusji, że dendrymery PAMAM charakteryzują się niską toksycznością, tym bardziej, iż w dalszej części dyskusji Doktorantka sama przytacza wiele badań świadczących o potrzebie modyfikowania powierzchni dendrymerów PAMAM w celu obniżenia ich toksyczności.

Doktorantka dyskutując spadek toksyczności dendrymerów PAMAM po zmodyfikowaniu ich powierzchni biotyną i pirydoksałem stwierdza, że może to być spowodowane dostarczeniem do komórek czynników troficznych w postaci witamin. Takie stwierdzenie zakłada rozpad biokoniugatu w komórce. Czy Doktorantka dysponuje wiedzą na temat stabilności biokoniugatu, która uprawdopodobniałaby tę hipotezę?

Pracę wieńczy imponująca **bibliografia** licząca 479 pozycji, w większości z ostatnich dziesięciu lat.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Praca napisana jest poprawnym językiem. Doktorantce nie udało się jednak uniknąć dość licznych błędów literowych oraz kilku niezręcznych sformułowań typu „*ekspozycja jednościennych nanorurek węglowych na skórę*”. Niezbyt zręcznym sformułowaniem jest też „*normalne fibroblasty*” – lepszym określeniem byłoby „fibroblasty prawidłowe”. Niejednokrotnie Doktorantka umieszcza zbyteczne apostrofy przy odmianie obcych nazwisk. Należy jednak podkreślić, że mimo tych niedociągnięć edytorskich praca od strony graficznej jest estetyczna i zawiera wiele starannie wykonanych rysunków.

Uwagi szczegółowe:

W Tabeli 1 brak jest konsekwencji w podawaniu generacji dendrymeru tworzącego koniugat z lekiem.

W opisie ryc. 36 brak jest odniesienia do stosowanych na rysunku opisów kolumn (a-b) i rzędów (A-C).

Podsumowanie recenzji

Aby zrealizować postawiony cel, Doktorantka musiała zgłębić wiele zagadnień teoretycznych oraz zapoznać się z licznymi technikami eksperymentalnymi. Moim zdaniem najwartościowsza część pracy dotyczy zbadania wnikania dendrymerów do komórek oraz ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Z tą częścią pracy wiąże się też najciekawsza obserwacja, że obecność biotyny na powierzchni dendrymerów nie zwiększa akumulacji dendrymeru w komórkach raka płaskonabłonkowego SCC-15.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka może poszczycić się sporym dorobkiem naukowym. Spośród pięciu prac (w których w większości jest drugim autorem), cztery prace są bezpośrednio związane z tematyką doktoratu i zawierają część wyników opisanych w recenzowanej rozprawie. Prace te zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR i posiadają współczynnik oddziaływania od 2,9 do 4,3.

Uważam, że praca Pani mgr Magdaleny Szuster pt. „Wpływ dendrymerów PAMAM oraz ich biokoniugatów z biotyną i pirydoksałem na właściwości biologiczne różnych typów komórek *in vitro*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. **Pracę doktorską Pani mgr Magdaleny Szuster oceniam pozytywnie i wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Szuster do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

B. Klejnt-Maculewicz