



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. 61 641 83 03

Dr hab. n. farm. Ewa Totoń
Pracownia Analizy Białek
Katedra i Zakład Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
tel. 61 641 83 05
e-mail: etoton@ump.edu.pl

Poznań, dnia 14.11.2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr Konrada Kuczyńskiego**

pt. „Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach właściwości biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych”

wykonanej pod kierunkiem

Promotor: dr hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB PAN

oraz **Promotora pomocniczego: dr inż. Bartosza Grześkowiaka**

Podstawa wykonania recenzji

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Konrada Kuczyńskiego przygotowana została na podstawie decyzji Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu z dnia 7 września 2022 roku. Przewód doktorski prowadzony jest w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ocena formalna pracy

Oceniana dysertacja została wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB PAN i promotora pomocniczego dr inż. Bartosza Grześkowiaka. Praca była realizowana w ramach programu „Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii” grant nr POWR.03.02.00-00-I032/16.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została napisana w języku polskim, liczy łącznie 131 stron, zawiera 25 rycin oraz 6 tabel. Dodatkowe 4 tabele, bez numeracji, znajdują się w części Materiały i metody. Tytuł rozprawy sformułowany został poprawnie i odpowiada

przedstawionym w ramach pracy rezultatom badań. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i składa się z 7 głównych rozdziałów (Wprowadzenie, Cel pracy, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Materiał i metody, Literatura) oraz rozdziału zawierającego załączniki. Ponadto w recenzowanej pracy zamieszczono na wstępie podziękowania, spis treści, dalej wykaz skrótów stosowanych w pracy oraz streszczenie w języku polskim i języku angielskim.

W dysertacji zacytowano aż 471 anglojęzycznych pozycji literaturowych z lat 1954 - 2022, z czego większość opublikowano po roku 2005. Wybrane piśmiennictwo jest bezpośrednio związane z tematem pracy, zostało właściwie dobrane i zacytowane. Tak liczny przegląd literatury świadczy o dogłębnym zrozumieniu tematu przez Doktoranta i potwierdza jego merytoryczne przygotowanie do realizacji zaplanowanych badań.

W ostatnim rozdziale pracy zamieszczono, w formie załącznika, spis dokonań publikacyjnych Doktoranta, natomiast szkoda, że nie dołączono dodatkowo Jego naukowego życiorysu. Zdaję sobie sprawę, iż nie jest to literalnie wymagane, ale na pewno ułatwiłoby czytającemu lepiej poznać Kandydata.

Ocena merytoryczna pracy

W rozdziale „Wprowadzenie” Autor szeroko opisał zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej, dzięki czemu przedstawiony został aktualny stan wiedzy oraz przesłanki do podjęcia badań. W pierwszym podrozdziale Doktorant przedstawił unikalne cechy molekularne nowotworów, leżące u podstaw procesu transformacji nowotworowej w celu lepszego zrozumienia procesu nowotworzenia, a co za tym idzie opracowania nowych form terapii przeciwnowotworowej. Jedną z najważniejszych cech nowotworów jest proces aktywacji inwazji komórek nowotworowych i powiązany z nim mechanizm przerzutowania. Stąd w dalszej części Autor opisał szczegółowo mechanizm inwazji komórek nowotworowych oraz macierz zewnątrzkomórkową (ECM), jej kluczowe składniki i rolę w procesie migracji komórek. Kolejny podrozdział poświęcony został wnikliwemu opisowi metod umożliwiających przyżyciowe badanie cech fizycznych komórek nowotworowych tj. siły adhezji czy sztywność pojedynczej komórki. W następnym podrozdziale uwaga Doktoranta skupiła się na opisanu jednostki chorobowej – glejaka wielopostaciowego. Główny to nowotwór złośliwy, który wyjątkowo trudno leczy się konwencjonalnymi metodami, ze względu na lokalizację w obrębie mózgu oraz wysoki potencjał do inwazji i migracji otaczających tkanek. Doktorant przedstawił w tej części epidemiologię glejaka, najczęstsze objawy, diagnostykę obrazową i molekularną oraz stosowane metody leczenia. Co istotne, wskazał jednocześnie na nowe możliwości terapii poprzez różne formy immunoterapii oraz wewnątrzkomórkowej

transport chemioterapeutyków z użyciem nanonośników. Kolejny podrozdział poświęcony został opisowi materii z zakresu nanotechnologii. Szczegółowo zaprezentowano różne typy nanocząstek oraz możliwości ich zastosowania w biologii i medycynie. Ostatni podrozdział zawiera prezentację różnych modeli badawczych glejaka oraz możliwości ich wykorzystania jako istotnych wariantów w kontekście prowadzenia zróżnicowanych badań naukowych. Uważam, że wszystkie zagadnienia opisane w rozdziale „Wprowadzenie” są dobrze przedstawione, ułożone w logiczną całość, a sposób pisania tekstu świadczy o doskonałym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta i dogłębnym zrozumieniu tematu. Z części tej wyłania się jasno sformułowany problem badawczy, z którym chce zmierzyć się Doktorant.

Głównym celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było badanie właściwości migracyjnych komórek nowotworowych oraz charakterystyka nanocząstek w celu określenia ich potencjału terapeutycznego w kontekście leczenia glejaka wielopostaciowego. Dodatkowo, ze względu na brak odpowiedniego modelu komórkowego idealnie odzwierciedlającego środowisko nowotworu w organizmie i pozwalającego na badanie mechanizmów inwazji, Doktorant postawił sobie za cel próbę wytworzenia takiej struktury.

Ze względu na złożoność założeń pracy doktorskiej, Autor podzielił jej wykonanie na trzy etapy, które finalnie punkt po punkcie realizował. W takim ujęciu szczegółowa tematyka badań dotyczyła:

1. Określenia wpływu syntetycznego miR-218 na właściwości migracyjne komórek glejaka wielopostaciowego.
2. Analizy biokompatybilności i bezpieczeństwa względem komórek nowotworowych badanych nanocząstek Mag@PEI i PDA w celu wykazania potencjalnego ich wykorzystania jako nośniki w terapii hamującej inwazję glejaka.
3. Wytworzenia nowego trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka przeznaczonego do badania procesów inwazji i przerzutowania oraz do oceny efektywności nowych terapeutyków o potencjale przeciwinwazyjnym wprowadzanych do komórki przy użyciu nanomateriałów.

Działania Doktoranta w zakresie prowadzenia badań naukowych są uporządkowane, przemyślane i świadczą o umiejętności planowania eksperymentów. Opis uzyskanych wyników jest klarowny, poparty licznymi rycinami i tabelami, które ułatwiają zrozumienie treści. Dyskusja rozprawy została bardzo dobrze przeprowadzona, oparta jest na odpowiedniej liczbie pozycji literaturowych. W tej części Doktorant udowodnił swoje przygotowanie

merytoryczne do prowadzenia badań oraz umiejętność krytycznego podejścia do uzyskanych wyników.

Pracę kończą cztery wnioski, które mają charakter obserwacyjny i wynikają z przeprowadzonych badań. Sformułowane wnioski są bardzo szczegółowe i co istotne dodatkowo wskazują, że realizacja tej pracy doktorskiej może mieć znaczenie aplikacyjne. Doktorant wykazał, że badany przez niego nanomateriał Mag@PEI, zbudowany z magnezytu i polietylenoiminy, nie powoduje efektów cytotoksycznych w komórkach glejaka, jak również w prawidłowych fibroblastach, dodatkowo jest neutralny względem DNA i mitochondriów co pozwala sugerować, że może mieć zastosowanie jako doskonałe narzędzie pozwalające na skuteczne wprowadzanie dwuniciowych cząsteczek RNA (dsRNA) do komórki glejaka wielopostaciowego w celu wyłączenia lub wyciszenia ekspresji wybranego genu. Co więcej Autor wykazał, że badany nanomateriał cechuje się większą efektywnością w dostarczaniu dsRNA do komórek glejaka w porównaniu z komercyjnie stosowanym lipidowym nośnikiem kwasów nukleinowych (LipofectamineTM). Liczne badania, prowadzone na całym świecie, dotyczące zjawiska interferencji RNA, wskazują jak kluczowy jest to obszar i jak ogromny ma potencjał ze względu na kontrolę przepływu informacji genetycznej. Dodatkowo budzi nadzieję na opracowanie w przyszłości nowych, skutecznych metod leczenia chorób nowotworowych opartych o wyznaczenie nowych celów molekularnych.

W ostatnim rozdziale Doktorant opisał zastosowane w badaniach materiały i metody. W części tej wyczerpująco i z należytą starannością opisano wybór linii komórkowych, i organoidowych do badań, procedury przeprowadzane na kulturach w trakcie hodowli, otrzymanie assembloudu HBO-GBO oraz protokół transfekcji z wykorzystaniem nanocząsteczek Mag@PEI. Równie dużo uwagi Autor poświęcił wnikliwemu opisowi metod zastosowanych do analizy cytotoksyczności, oceny genotoksyczności i mitotoksyczności, analizy wpływu nanocząstek na procesy związane ze stresem oksydacyjnym poprzez pomiar aktywności enzymów tj. katalaza i peroksydaza glutationowa, oceny ekspresji genów oraz badań cech fizycznych komórek nowotworowych. Pragnę nadmienić, że nie zauważyłam luk oraz błędów w opisach stosowanych procedur. Nie budzi to wątpliwości, że opisane przez Doktoranta metody są powtarzalne. Co więcej, tak przedstawione, świadczą o Jego bardzo dobrym warsztatowym przygotowaniu do pracy eksperymentalnej w laboratorium.

Pod względem edytorskim cały test został przygotowany bardzo starannie, występują nieliczne błędy literowe. Na pochwałę zasługuje również poprawnie stosowana przez

Kandydata terminologia. Ponadto szata graficzna pracy jest przyjemna dla oka i podnosi jej wartość estetyczną.

P1. Z ciekawości Recenzenta proszę Doktoranta o wypowiedź, czy nanomateriał Mag@PEI badany przez niego może zostać użyty w koniugacji z lekami stosowanymi w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Jeśli tak, to z jakimi i czy może zostały już w tej kwestii podjęte jakieś badania?

Uwagi

Drobne uwagi szczegółowe, które z funkcji Recenzenta muszę wskazać:

1. Dodałabym wniosek 5 do rozdziału Wnioski, w którym zawarłabym informację, że w ramach prowadzonych badań udało się stworzyć nowy hybrydowy model badawczy zawierający zarówno komórki zdrowego mózgu oraz komórki nowotworowe glejaka, który może stanowić doskonały układ do badania mechanizmów inwazji nowotworowej.
2. Brak angielskich nazw przy niektórych skrótach wypisanych w wykazie skrótów stosowanych w pracy (strona 6). Należałoby to ujednolicić.
3. Brak numeracji czterech tabel zamieszczonych w rozdziale Materiały i metody (strona 91, 92, 93).
4. W opisach niektórych rycin Autor zastosował formę wykropkowania „(...)” dla skrócenia pełnej nazwy publikacji, w której to wyniki Jego badań zostały zaprezentowane. Forma ta wygląda co najmniej dziwnie, obrazuje urwane zdanie w połowie (rycina 3, 4, 5, 7). Taka prezentacja nie przystoi opracowaniu będącemu rozprawą doktorską.
5. Zabrakło, w formie załącznika do wglądu, pozwolenia Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Nr. 46/13) na pozyskanie i przetwarzanie ludzkich komórek pochodzących z resekcji nowotworów mózgu, o którym mowa w rozdziale Materiał i metody, podrozdział 6.2.2.
6. Ponadto sugerowałabym dołączenie, również w formie załącznika w ostatnim rozdziale, życiorysu naukowego Doktoranta, co zapewne przybliżyłoby Jego wizerunek jako już doświadczonego badacza.

Nadmienię, że powyższe uwagi i sugestie nie mają wpływu na poziom naukowy dysertacji, który oceniam bardzo wysoko.

Całościowa ocena wartości naukowej i wnioski końcowe recenzji

Reasumując, rozprawę doktorską mgr Konrada Kuczyńskiego ogólnie oceniam jako znakomitą. Praca ta wykonana jest bardzo solidnie i co ważne niesie duży ładunek nowości naukowej, daje nadzieję na rozwój nowych terapii dla pacjentów dotkniętych glejakiem wielopostaciowym. Biorąc pod uwagę oryginalność przeprowadzonych doświadczeń, bogaty wachlarz stosowanych samodzielnie przez Doktoranta nowoczesnych technik biologii molekularnej oraz generalnie znajomość szerokiej wiedzy teoretycznej przedstawionej w opracowaniu stwierdzam, że Kandydat posiada predyspozycje do samodzielnego prowadzenia badań naukowych w przyszłości.

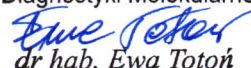
Dodatkowo, co należy podkreślić, wyniki uzyskane w ramach prowadzonych przez Doktoranta badań zostały już częściowo opublikowane w recenzowanym, bardzo dobrym czasopiśmie (Journal of Cellular and Molecular Medicine, o współczynnikach IF 5.295 i MEiN 100 pkt). Zakładam, że z reszty wyników powstanie kolejna, równie wartościowa publikacja.

Wnioski końcowe

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz w Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) **i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr Konrada Kuczyńskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**

Jednocześnie, co pragnę podkreślić, mając na uwadze wysoki poziom naukowy przedmiotowej dysertacji i jej walory użytkowe, przedstawiam do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Molekularnej


dr hab. Ewa Totoń