



Prof. UAM dr hab. Joanna Gościańska
Zakład Technologii Chemicznej
tel. (61) 829-16-07
e-mail: joanna.goscianska@amu.edu.pl

Poznań, 18.11.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego
zatytułowanej

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

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego została zrealizowana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem prof. ICHB PAN dr hab. Katarzyny Rolle, promotora pracy, oraz dr. inż. Bartosza Grześkowiaka pełniącego funkcję promotora pomocniczego. Temat rozprawy doktorskiej dotyczy istotnego zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak również aplikacyjnego, zagadnienia, a mianowicie wykorzystania nanotechnologii w badaniach właściwości biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych.

Najnowsze dane epidemiologiczne wskazują, że liczba chorych na nowotwory w ostatnich latach nieustannie rośnie. Stanowi to ogromne wyzwanie nie tylko dla lekarzy, ale również dla całego społeczeństwa. Choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie i choć badania nad nowymi sposobami ich leczenia oraz zrozumieniem procesu nowotworzenia są intensyfikowane, to nie udaje się zmniejszyć współczynnika zachorowań. Przebieg chorób nowotworowych oraz odpowiedź na terapię są bardzo zróżnicowane. Obserwowane różnice międzyosobnicze zależą przede wszystkim od typu



choroby nowotworowej, jednak coraz częściej zwraca się uwagę na problem lekooporności oraz nadmiernej lekowrażliwości pacjentów. Chorzy na glejaka mózgu są obciążeni złym rokowaniem i nowotwór ten jest wciąż największym wyzwaniem dla współczesnej onkologii. Jedną z przyczyn tego stanu może być wysoki potencjał komórek glejaka do inwazji oraz migracji. Zrozumienie mechanizmów inwazji może prowadzić do wyznaczenia nowych celów molekularnych terapii przeciwko temu nowotworowi. Leczenie nowotworów złośliwych mózgu może nie być skuteczne ze względu na brak możliwości interwencji chirurgicznej, obecność bariery krew-mózg oraz neurotoksyczność środków stosowanych miejscowo. Dlatego też, prowadzi się poszukiwania nowych substancji oraz nowych właściwości biologicznych w kierunku ograniczania wzrostu i niszczenia komórek nowotworowych. Wielkie nadzieje pokłada się w nanotechnologii. Odpowiednio zaprojektowane nanocząstki mogą być stosowane w terapii przeciwnowotworowej jako nośniki związków terapeutycznych, co powoduje wzrost ich biodostępności i akumulacji w obszarze guzów. Opłaszczenie nanocząstek specyficznymi ligandami lub przeciwciałami umożliwi celowaną terapię, co nie tylko może zwiększyć skuteczność leczenia, ale także istotnie zmniejszyć cytotoksyczność na komórki prawidłowe. Zagadnienia te podejmowane są przez Doktoranta w recenzowanej pracy doktorskiej, co świadczy o aktualności problemu badawczego, jak i umiejętności doboru oryginalnej tematyki badawczej.

Oceniana rozprawa doktorska została zredagowana w języku polskim i przedstawiona na 130 stronach maszynopisu z wyłączeniem kopii publikacji, której Pan mgr Konrad Kuczyński jest współautorem. Tytuł rozprawy został sformułowany poprawnie i odpowiada przedstawionym wynikom badań. Pierwsza część pracy obejmuje *Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenia* w języku polskim i angielskim oraz *Wprowadzenie*. Kolejne rozdziały to: *Cel pracy, Wyniki, Dyskusja, Wnioski*, a także *Materiały i metody*. Praca zakończona jest spisem literatury obejmującym 471 pozycji bibliograficznych. Podział pracy na poszczególne rozdziały jest prawidłowy i porządkuje jej treść. Oceniana rozprawa zawiera 25 rycin i 10 tabel, jednakże tabele umieszczone w części *Materiały i metody* nie zostały przez Autora ponumerowane.



Wprowadzenie do dysertacji Doktorant poświęcił problematyce dotyczącej nowotworów oraz ich unikalnym cechom, które mają zasadnicze znaczenie w opracowywaniu nowych form terapii przeciwnowotworowych. Następnie skoncentrował się na szczegółowej charakterystyce glejaka – stanowiącego około 70% wszystkich pierwotnych nowotworów centralnego układu nerwowego. Doktorant przedstawił objawy związane z występowaniem glejaka, jego możliwości diagnostyczne oraz terapeutyczne, wskazując na ich ograniczenia. Bardzo ciekawym elementem części teoretycznej pracy było zaprezentowanie czynników wpływających na rozwój glejaka oraz kierunków badań intensyfikowanych w celu obniżenia potencjału proliferacyjnego jego komórek. Dodatkowo Pan mgr Konrad Kuczyński dokonał przeglądu literaturowego w obszarze nanomateriałów stosowanych jako nośniki leków przeciwnowotworowych przyczyniających się do zwiększenia skuteczności terapii onkologicznych oraz mogących niwelować ich skutki uboczne. Mimo, że Autor szeroko opisał różnego rodzaju nanocząstki i starał się wprowadzić w tematykę zagadnień badawczych to ta część pozostawia pewien niedosyt. Brakuje mi w niej krytycznej dyskusji związanej z realnymi możliwościami wykorzystania nanocząstek polimerowych jako systemów dostarczania terapeutyków oraz postępów jakie zostały dokonane w ostatnich latach w ich syntezie oraz stabilności. Ostatni rozdział wprowadzenia dotyczy różnych modeli glejaka stosowanych w badaniach podstawowych i aplikacyjnych.

Podsumowując część teoretyczną można stwierdzić, że została ona dobrze zaplanowana i pozwoliła Doktorantowi określić nieopisane do tej pory w literaturze problemy badawcze, które były inspiracją do nakreślenia podstawowych etapów prac eksperymentalnych.

Analiza literaturowa była podstawą do sformułowania nadrzędnego celu pracy, którym było zbadanie właściwości migracyjnych komórek nowotworowych, charakterystyka i określenie potencjału terapeutycznego nanocząstek, a także stworzenie i optymalizacja modelu komórkowego glejaka. Autor przedstawił również szereg celów szczegółowych, spośród których należy przede wszystkim wymienić:

- określenie wpływu miR-218 na właściwości migracyjne komórek glejaka wielopostaciowego z wykorzystaniem szeregu technik biologii molekularnej;



- ocenę cytotoksyczności nanocząstek magnetycznych opłaszczonych polietylenoiminą oraz nanocząstek polimerowych zbudowanych z polidopaminy mogących stanowić układy dostarczania leków przeciwnowotworowych;
- budowę nowego trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka przeznaczonego do badania procesów inwazji nowotworowej oraz oceny efektywności nowych leków o potencjale przeciwinwazyjnym. Model został oparty na hybrydowej kulturze zawierającej organoid odzwierciedlający budowę zdrowy mózg oraz organoid wywodzący się bezpośrednio z tkanki glejaka.

W kolejnej części Pan mgr Konrad Kuczyński omówił szczegółowo wyniki przeprowadzonych badań, na podstawie których wyciągnął szereg bardzo istotnych wniosków. Wykazał między innymi, że zwiększony potencjał migracyjny komórek glejaka, obniżona zdolność przylegania komórek do podłoża oraz ich niższa sztywność korelują z niskim poziomem ekspresji miR-218-5p przy jednocześnie wysokim poziomie białek macierzy – tenascyny-C i syndekanu-2. Ponadto, Doktorant udowodnił, że miR-218-5p bezpośrednio i pośrednio wpływa na poziom ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za fizyczne cechy komórki np. jej zdolności do przemieszczania się oraz na otoczenie komórkowe modyfikując skład macierzy zewnątrzkomórkowej. Wyniki analizy zmian adhezji potwierdziły znaczące podniesienie zdolności przylegania komórek glejaka do podłoża w obecności miR-218-5p, które mogą być związane z obniżeniem ekspresji genu α -aktyliny. Sztywność komórek suplementowanych miR-218-5p wzrosła o 30% w stosunku do komórek kontrolnych. Pan mgr Konrad Kuczyński wykazał, że nanocząstki magnetyczne opłaszczone polietylenoiminą nie powodują efektów cytotoksycznych ani w komórkach glejaka, ani w ludzkich fibroblastach. Fakt ten przypisuje się osłonowej funkcji polietylenoiminy w stosunku do magnetytowego rdzenia nanocząstek. W przypadku zastosowanego nanomateriału nie zaobserwowano generowania w komórkach stresu oksydacyjnego związanego z podwyższonym poziomem reaktywnych form tlenu. Stąd też posiada on duży potencjał do bezpiecznego przenoszenia dsRNA do komórek ludzkich. W pracy doktorskiej przedstawiono również badania wpływu nanocząstek polidopaminy o rozmiarach 100, 140 i 240 nm na żywotność komórek ludzkich. Wykazały one, że najmniejszą toksycznością



charakteryzują się nanocząstki o wielkości 100 nm. Jednocześnie Doktorant podkreślił, że w celu optymalizacji rozmiaru nanocząstek stosowanych jako nośniki aktywnych substancji farmaceutycznych konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych testów np. w kierunku generowania stresu oksydacyjnego, który może działać destrukcyjnie na wiele elementów komórkowych, ostatecznie prowadząc do apoptozy. Bardzo ciekawym elementem pracy było stworzenie i optymalizacja nowego hybrydowego modelu badawczego opartego na organoidzie przypominającym budową zdrowy mózg oraz organoidzie bazującym na komórkach glejaka. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant realizował te badania na stażu naukowym w Berlin Institute for Medical Systems Biology, Max Delbrück Center for Molecular Medicine pod kierunkiem Pani dr Agnieszki Rybak-Wolf. Wygenerowane organoidy wykazywały się dużą gęstością komórek, co może wskazywać na silne połączenia między komórkami nowotworu. Wysoka gęstość uzyskanego organoidu znacząco ograniczyła możliwości penetracji tej struktury przez barwniki stosowane do oznaczenia struktur komórkowych pomimo wykorzystania procedur utrwalania i permabilizacji błon komórek organoidów. Optymalizacja stworzonego modelu trójwymiarowego pozwoli w przyszłości na precyzyjne badania mechanizmów inwazji nowotworowej, a także analizy farmakokinetyczne potencjalnych leków, czy też analizy ich toksyczności.

W ostatniej części pracy doktorskiej – rozdziale *Materialy i metody*, Pan mgr Konrad Kuczyński przedstawił spis stosowanych odczynników chemicznych, hodowli komórkowych oraz procedur przeprowadzanych na komórkach. Ponadto opisał testy cytotoksyczności wykonane dla nanomateriałów, metody wykorzystane w celu określenia właściwości fizycznych komórek nowotworowych, a także badania ekspresji genów. Trzeba podkreślić, że ich dobór jest dobrze przemyślany.

Pan mgr Konrad Kuczyński przedstawił szeroki zakres pracy jaki realizował, aby osiągnąć postawione sobie cele. Zrealizowanie celów rozprawy wymagało opanowania dużych umiejętności eksperymentalnych. Biorąc pod uwagę następujące elementy pracy: dobór tematu, zastosowane metody i uzyskane wyniki, wyrażam przekonanie, że oceniana praca zawiera wiele elementów nowości naukowych. Autor dobrze dobrał i zastosował metody badawcze i prawidłowo przeprowadził interpretację otrzymanych wyników.



Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie wskazać kilka kwestii dyskusyjnych czy problematycznych. Jestem przekonana, że Doktorant dołożył wszelkich starań, aby praca była zredagowana jak najlepiej, natomiast nie ustrzegł się on licznych błędów edytorskich oraz językowych. Ponadto, w pracy doktorskiej brakuje podsumowania dotychczasowej działalności naukowej Doktoranta, jego publikacji, wystąpień konferencyjnych, czy też udziału w grantach. Jednakże te nieścisłości i błędy nie wpływają na moją pozytywną ocenę przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej.

Poniżej pozwolę sobie zaprezentować natomiast kwestie do dyskusji:

1. Nie podlega wątpliwości, że tematyka rozprawy jest interesująca z naukowego punktu widzenia – czy mogę jednak prosić o wskazanie najważniejszego, według Autora, osiągnięcia naukowego? Który etap prac badawczych był kluczowy i dlaczego?
2. Co skłoniło Doktoranta do zastosowania w pracy nanocząstek magnetycznych opłaszczonych polietylenoiminą oraz nanocząstek polimerowych zbudowanych z polidopaminy?
3. W pracy Doktorant nie przedstawił żadnych informacji dotyczących syntezy oraz właściwości fizykochemicznych stosowanych nanomateriałów. Uważam, że są one kluczowe w przypadku określenia możliwości ich zastosowania jako potencjalnych układów dostarczania leków przeciwnowotworowych.
4. Czy zastosowane w badaniach nanocząstki były stabilne?
5. Czy Doktorant rozważał zastosowanie w swoich badaniach innych nanomateriałów? Jeśli tak, to jakich?
6. Jak Doktorant ocenia możliwość rzeczywistego zastosowania nanocząstek magnetycznych opłaszczonych polietylenoiminą oraz nanocząstek polimerowych zbudowanych z polidopaminy jako nośników leków w terapiach onkologicznych?

Podsumowując, jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny – nauki biologiczne. Realizacja badań wymagała od Doktoranta dużej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności praktycznych. Podjęcie tematu badawczego uważam za celowe i w pełni uzasadnione. Doktorant posiada



odpowiednie przygotowanie dla rozwiązania postawionych problemów, co w pełni wykazał w rozprawie doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana „*Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach właściwości biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych*” spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. 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.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Joanna Gościanńska