

Warszawa, 18.11.2021 r.

Prof. Dr hab. inż. Tomasz Ciach
Politechnika Warszawska
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa

RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Drożdż
pt. „Characterization and synthesis of drug carriers based on
artificial exosomes dedicated to treatment of the microangiopathic
complications of diabetes”**

(Promotor: Prof. dr hab. Ewa Stępień)

Wprowadzenie

Ludzie zawsze chcieli żyć długo i w pełni zdrowia. Marzenie to napędza tysiące naukowców, lekarzy i farmaceutów na całym świecie w ich pracy nad urzeczywistnieniem tego dążenia ludzkości. Rezultaty tych wysiłków już są imponujące, w ciągu ostatnich 100 lat średnia długość życia ludzi na ziemi uległa podwojeniu (Max Roser, 2018, "Life Expectancy"), niemniej ciągle wiele pozostaje w tym względzie do zrobienia. Ten wzrost średniej długości życia w ciągu ostatniego wieku zawdzięczamy głównie upowszechnieniu higieny, szczepieniom i antybiotykami, a także ogólnej poprawie warunków żywieniowych i dostępowi do czystej wody. Dalsze powiększanie średniej długości życia oraz zapewnienie ludziom długotrwałego zdrowia wymaga coraz częściej sięgania po bardzo złożone i często drogie rozwiązania – terapie. Obecnie szczególnie istotne staje się wykorzystanie w medycynie wiedzy pochodzącej z najnowszych odkryć w dziedzinie biologii oraz wykorzystanie osiągnięć pochodzących z innych dyscyplin naukowych. Niniejszy doktorat jest przykładem tej tendencji w nauce. W recenzowanej pracy pokazano opracowanie nowego systemu do dostarczania

leków do komórek. Technologia ta polega na wykorzystaniu modyfikowanych egzosomów w leczeniu powikłań cukrzycy w obszarze komplikacji – patologii mikronaczyniowych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Drożdż, pod tytułem “Characterization and synthesis of drug carriers based on artificial exosomes dedicated to treatment of the microangiopathic complications of diabetes”, została napisana po angielsku i obejmuje opracowanie i przeprowadzenie syntezy sztucznych egzosomów o potencjalnym zastosowaniu leczniczym. Egzosomy to jedna z trzech odmian pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zbudowane są z błony komórkowej i zawierają różne czynniki biologiczne: białka, krótkie kwasy nukleinowe, specyficzne lipidy błonowe. Egzosomy są wydzielane przez większość komórek eukariotycznych, w organizmach złożonych pełnią one ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej zarówno w stanach normalnych jak i patologicznych. Od momentu ich odkrycia są intensywnie badane, jako czynnik mogący znaleźć zastosowanie zarówno w diagnostyce jak i w terapii wielu chorób metabolicznych oraz nowotworowych. Pierwsze obserwacje egzosomów publikowane były w latach 60-tych aczkolwiek nazwa „extracellular vesicle” – EVs po raz pierwszy pojawiła się w publikacjach z 1971 roku. Praca doktorska Pani Anny skupia się właśnie na zastosowaniu sztucznych EVs będących produktami fuzji naturalnych EVs i sztucznie wytworzonych liposomów. Podejście to pozwala na wykorzystanie naturalnych nośników do przenoszenia wprowadzonego do nich drogą fuzji z liposomami ładunku - miRNA. Proponowanym przez Panią Annę zastosowaniem tak otrzymanych EVs jest leczenie patologicznych zmian w obrębie małych naczyń krwionośnych spowodowanych cukrzycą. Wybór choroby jest bardzo dobry ze względu na jej coraz powszechniejsze występowanie i poważne komplikacje, jakie wywołuje. Długotrwałe zwiększony poziom glukozy we krwi powoduje patologiczne zmiany na poziomie małych naczyń krwionośnych, które mogą prowadzić do utraty wzroku, uszkodzenia nerek czy utrudnionego gojenia się ran. Jako czynnik leczniczy w tak wytworzonym systemie celowanego podawania zastosowano anty-miR-221-3p. Znaczenie miR-221-3p jest opisane w literaturze patologii mikro-naczyniowych towarzyszących cukrzycy. Jako wskaźnik skuteczności działania przyjęto ekspresję znanego z badań czynnika TIMP-3, inhibitora metaloproteinaz.

Praca Doktorska Pani Anny Drożdż jest bardzo dobrze zaplanowanym szlakiem syntezy syntetycznych EVs zawierających anti-miR-221-3p, w którym wszystkie kolejne kroki są potwierdzane przez szereg analiz i optymalizowane. Czynniki anti-miR-221-3p był wprowadzany do EVs na drodze fuzji z liposomami. Efektywność fuzji EVs i liposomów była oceniana na podstawie zjawiska FRET, co uważam, że jest bardzo eleganckim rozwiązaniem. Finalna skuteczność działania zaproponowanego i wykonanego czynnika terapeutycznego, syntetycznych EVs zawierających anti-miR-221-3p, dokładnie ich wpływ na ekspresję TIMP-3, została potwierdzona w eksperymencie z komórkami HUVEC, wykonano badania qPCR, western blot, badanie ekspresji metaloproteinaz oraz metodą wound healing assay. W ten sposób potwierdzono słuszność obranej długiej drogi badawczej.

Uzyskane w ramach wykonywania doktoratu wyniki ukazały się ponadto w jedenastu publikacjach oraz były prezentowane na ośmiu wystąpieniach konferencyjnych. Publikacje ukazały się w ciągu czterech lat wykonywania pracy doktorskiej (2016-2020). Uważam, że taki dorobek publikacyjny powstały w tak krótkim okresie intensywnej pracy nad doktoratem to bardzo dobre osiągnięcie. Tym bardziej, że prace eksperymentalne z zakresu biologii komórkowej i biochemii wymagają sporego wysiłku od eksperymentatora i pochłaniają dużo czasu...

Uwagi krytyczne

Przebieg prac eksperymentalnych został bardzo dobrze zaplanowany i przeprowadzony wraz z szeregiem badań potwierdzających poprawność założeń i przebieg kolejnych kroków. Opis wszystkich kolejnych kroków i wyników pomiarów został przedstawiony w sposób precyzyjny i wyczerpujący. Niemniej do samego opisu tych badań - tekstu samej pracy, wkraść się szereg błędów edytorskich czy nieścisłości w opisie czy nazewnictwie różnych związków chemicznych. Na początku natknąłem się na błąd w najważniejszym słowie tej rozprawy – „egzosomy” w Streszczeniu... Skrót „et al.” nawet w tekście angielskim pozostaje skrótem łacińskim od et alii, et aliae, et alia, nigdzie tu nie występuje podwójne „l” nie wiem czemu znalazło się w tekście pracy, no i samo „et” nie jest skrótem, więc kropka po „et” nie jest potrzebna (str.80). Spis symboli zamieszczony w pracy jest niekompletny, na przykład nie zawiera skrótu DOSPA, zresztą w nazwie chemicznej tego związku jaką znajdujemy w tekście pracy (str.79) jest


błąd. Na szczęście da się go odszukać na podstawie skrótu w bazie danych IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Generalnie przedstawione w tekście nazwy związków chemicznych są niespójne, podawane zgodnie z różnymi standardami nazewnictwa i raz z wykorzystaniem nawiasów kwadratowych raz okrągłych. Zalecałbym na przyszłość przyjęcie jednego standardu – najlepiej właśnie zgodnego z zaleceniami IUPAC. Mam też uwagi odnośnie podawania wyników pomiaru / eksperymentu, oraz towarzyszącego mu błędu pomiaru. W zasadzie nie ma sensu przedstawianie błędu pomiaru większego – dłuższego niż dwie cyfry znaczące a prezentowany wynik pomiaru – jego dwie ostatnie cyfry znaczące nie powinny być mniejsze, co do zakresu, od prezentowanego błędu pomiaru. W kilku miejscach pracy przedstawiając wyniki odstąpiono od tej zasady.

Co do przyjętego szlaku syntezy egzosomów i zastosowanych metod analitycznych uwag nie mam.

Wnioski końcowe

Przedstawiona przez Panią mgr Annę Drożdż rozprawa doktorska pt. “Characterization and synthesis of drug carriers based on artificial exosomes dedicated to treatment of the microangiopathic complications of diabetes” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, zaś Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia eksperymentalnej pracy badawczej. Wykazała się również umiejętnością krytycznej analizy otrzymanych w laboratorium wyników oraz jej odpowiedniego przedstawiania. Pracę uważam za poprawnie napisaną a zamieszczone w recenzji uwagi krytyczne nieznacznie tylko umniejszają jej odbiór.

Stwierdzam, że całkowicie spełnione zostały wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w dziedzinie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), wobec czego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Anny Drożdż do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. Dr Tomasz Ciach