



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Prof. dr hab. Barbara Klajnert-Maculewicz
Katedra Biofizyki Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 22 lutego 2022 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego

**pt. „Optymalizacja właściwości biologicznych dendrymerów poliamidoaminowych generacji trzeciej (PAMAM G3) w celu otrzymania wydajnego i ukierunkowanego nośnika dla stosowanych i perspektywicznych leków przeciwnowotworowych”,
dorobku naukowego, działalności dydaktycznej i organizacyjnej
w postępowaniu habilitacyjnym dr. Łukasza Urama**

Przedstawiona do oceny dokumentacja obejmuje:

1. Wniosek z dn. 26 maja 2021 r. o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne
2. Załącznik nr 1 – dane wnioskodawcy
3. Załącznik nr 2 – kopia dyplomu uzyskania stopnia naukowego doktora
4. Załącznik nr 3 – autoreferat
5. Załącznik nr 4 – wykaz osiągnięć naukowych
6. Dziesięć publikacji stanowiących osiągnięcie badawcze:
 - I. Uram et al. *Int. J. Nanomed.* 2013:8, 4707
 - II. Uram et al. *Int. J. Nanomed.* 2015:10, 5647
 - III. Uram et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017:102, 275
 - IV. Uram et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2017:25, 706

- V. Czarnik-Kwaśniak et al. *J. Drug Del. Sci. Technol.* 2020:55, 101424
 - VI. Uram et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018:124, 1
 - VII. Uram et al. *Molecules* 2019:24, 3801
 - VIII. Uram et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2020:152, 105439
 - IX. Uram et al. *Biomolecules* 2019:9, 437
 - X. Zaręba et al. *Int. J. Molec. Sci.* 2019:20, 4998
7. Oświadczenia współautorów publikacji stanowiących osiągnięcie badawcze o ich wkładzie w te prace

Sylwetka naukowa Habilitanta

Pan dr Łukasz Uram w 2008 r. uzyskał tytuł magistra biologii na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego po przedstawieniu pracy pt. „Wpływ czynników neuroprotektynowych na ekspresję białka S-100 β w formacji hipokampa u szczurów”. Następnie na tym samym Wydziale został słuchaczem Studium Doktoranckiego. W 2012 r. dr Łukasz Uram obronił z wyróżnieniem rozprawę doktorską pt. „Podatność na napady drgawkowe u szczura po podaniu wybranych leków immunosupresyjnych. Rola składników formuły farmaceutycznej”. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych Habilitant rozpoczął pracę na stanowisku adiunkta w Katedrze Kosmetologii Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie. Od 2013 r. Habilitant jest zatrudniony na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej, początkowo na stanowisku adiunkta, a obecnie jako profesor uczelni w grupie pracowników badawczo-dydaktycznych ze stopniem doktora.

Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe Habilitant przedstawił cykl dziesięciu prac doświadczalnych opublikowanych w latach 2013-2020. Wszystkie prace ukazały się w indeksowanych czasopismach o współczynnikach oddziaływania (IF) w przedziale od 2,881 do 4,556, tj. w *International Journal of Nanomedicine (Dovepress)* – 2 artykuły, w *European Journal of Pharmaceutical Sciences (Elsevier)* – 3 artykuły, w *Bioorganic and Medicinal Chemistry (Elsevier)*, w *Journal of Drug Delivery Science and Technology (Elsevier)*, w *Molecules (MDPI)*, w *Biomolecules (MDPI)* i w *International Journal of Molecular Sciences (MDPI)*.

Wszystkie prace składające się na osiągnięcie naukowe są wieloautorskie (posiadają od sześciu do ośmiu autorów). W ośmiu pracach pan dr Łukasz Uram jest pierwszym autorem, z czego siedem razy autorem korespondencyjnym. Jego wkład procentowy w te prace waha się od 45 do 65%. W dwóch pracach Habilitant jest piątym autorem. Dla ścisłości nadmienię, iż w pracy V Habilitant deklaruje, iż jego wkład wynosi 20%, podczas gdy uwzględnienie deklaracji pozostałych współautorów wskazuje na wkład 10%.

Z racji na recenzowanie w 2018 roku rozprawy doktorskiej pani dr Magdaleny Szuster pt. „Wpływ dendrymerów PAMAM oraz ich biokoniugatów z biotyną i pirydoksałem na właściwości biologiczne różnych typów komórek in vitro” jestem w posiadaniu powyższej rozprawy. W tej pracy doktorskiej (mającej formę monografii) zamieszczonych jest wiele wyników, których autorem, zgodnie z oświadczeniem pana dr Łukasza Urama dołączonym do rozprawy habilitacyjnej, jest Habilitant. Poniżej przytaczam fragmenty oświadczenia dr. Łukasza Urama i konfrontuję je z zawartością pracy doktorskiej pani dr Magdaleny Szuster.

W pracy I:

- wykonanie testów na cytotoksyczność na linii komórkowej BJ
- wykonanie barwień z użyciem przeciwciał na apoptozę (linia komórkowa BJ i SCC-15)
- uzyskanie, obróbka i analiza obrazów z mikroskopu konfokalnego

Tymczasem wyniki testu cytotoksyczności z solami tetrazolowymi XTT dla linii komórkowej BJ oraz testu z czerwienią obojętną dla tej samej linii (Fig. 5 w artykule) były prezentowane na str. 68 rozprawy doktorskiej pani dr Szuster (Ryc. 23 B i 23 A). Obrazy otrzymane przy użyciu mikroskopu konfokalnego przedstawiające poziom markera apoptozy PARP-1 w komórkach linii BJ (Fig. 6 w artykule) zostały pokazane na str. 71 rozprawy doktorskiej (Ryc. 25 A). Porównanie proapoptycznego działania dendrymerów PAMAM i BC-PAMAM dla linii komórkowej BJ (Fig. 7 w artykule) przedstawiono na str. 70 pracy doktorskiej (Ryc. 24).

W pracy II:

- przeprowadzenie badań biologicznych na linii komórek BJ, w tym zebranie, analiza i opracowanie graficzne wszystkich obrazów mikroskopowych

W pracy doktorskiej pokazano: na str. 76 (Ryc. 30) wewnątrzkomórkową lokalizację dendrymerów PAMAM i BC-PAMAM w komórkach BJ (Fig. 4 w artykule), na str. 79 (Ryc. 32 A) obrazy mikroskopowe przedstawiające wnikanie dendrymerów do jąder komórkowych linii BJ (Fig. 6 w artykule), zaś na str. 78 (Ryc. 31) analizę nakładania się sygnału pochodzącego od wyznakowanego fluorescencyjnie dendrymeru i wybarwionych jąder komórkowych (Fig. 8 w artykule). Analogiczne badania dla lokalizacji dendrymerów w mitochondriach (Fig. 9A i 10) zostały wcześniej opublikowane w pracy doktorskiej (odpowiednio na str. 83, Ryc. 34 i str. 82, Ryc. 33).

W pracy III:

- przeprowadzenie badań biologicznych z wyłączeniem części zrealizowanej przez M. Szuster, w tym zebranie, analiza i obróbka graficzna wszystkich obrazów mikroskopowych.

Pani dr Magdalena Szuster-Głuszczyk oświadczyła, że jej udział polegał na wykonaniu badań i ich analizie dla linii komórkowej SCC-15.

W pracy doktorskiej zaprezentowano obrazy mikroskopowe migracji komórek BJ (str. 75 Ryc. 29 A) i analizę tempa migracji tych komórek (str. 73 Ryc. 28 A) opublikowane w artykule III (Fig. 5).

Wyszczególnione powyżej pokrywanie się tematyczne rozprawy doktorskiej dr Magdaleny Szuster i rozprawy habilitacyjnej dr Łukasza Urama jest o tyle zastanawiające, że pan dr Łukasz Uram pełnił w przewodzie doktorskim pani Magdaleny Szuster rolę promotora pomocniczego. Musiał mieć zatem świadomość, że część włączonych do rozprawy habilitacyjnej wyników stała się wcześniej podstawą do uzyskania stopnia doktora przez panią dr Magdalenę Szuster. Wykorzystanie częściowo tych samych wyników w dwóch postępowaniach awansowych uważam za nieprawidłowe i w dalszej części oceny rozprawy habilitacyjnej będę głównie koncentrować się na ocenie prac IV-X.

Habilitant postawił sobie za cel zwiększenie biokompatybilności dendrymerów PAMAM, aby uzyskać wydajne i ukierunkowane nośniki dla już stosowanych i perspektywicznych leków przeciwnowotworowych.

Drogą do osiągnięcia tego celu było wpięrow skoniugowanie dendrymeru PAMAM G3 z biotyną i pirydoksałem. Koncepcja dołączenia biotyny do powierzchni dendrymeru w celu uzyskania zwiększonej akumulacji dendrymeru w komórkach nowotworowych nie jest nowa i została wcześniej opisana przez Yang i wsp. (*Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates*. Eur. J. Med. Chem. 2009:44, 862). Niemniej, te dwa układy eksperymentalne nie są tożsame i należy przyznać, iż aspekt biotynacji powierzchni dendrymerów nie jest szczególnie intensywnie eksplorowany przez badaczy. Aby zaobserwować zwiększoną w komórkach akumulację dendrymerów zmodyfikowanych biotyną, zasadne jest wybranie linii komórkowej charakteryzującej się nadekspresją receptorów biotyny (np. komórek HeLa, czy A-549). W pracach I i II ten aspekt nie jest dyskutowany, ani nie jest podane uzasadnienie zastosowania komórek linii BJ (prawidłowych fibroblastów) i SCC-15 (komórek raka płaskonabłonkowego). Co więcej, w pracy II nie udało się dowiedzieć, że zmodyfikowane dendrymery łatwiej wnikają do wnętrza komórek. Udało się natomiast zrealizować cel, jakim było obniżenie toksyczności koniugatu w porównaniu do natywnego dendrymeru PAMAM (prace I-III). Kolejna modyfikacja powierzchni dendrymeru resztą cukrową D-glukoheptono-1,4-laktonu (GHL) jeszcze bardziej obniżyła toksyczność dendrymeru (praca IV). W pracy też rozszerzono model badawczy o komórki glejaka (linia U-118 MG), które okazały się najbardziej wrażliwe na działanie dendrymerów. Udało się tym razem wykazać, że dołączenie biotyny do zmodyfikowanego resztą cukrową dendrymeru zwiększa akumulację dendrymeru w komórkach.

O ile prace I-IV służyły badaniu różnych modyfikacji dendrymeru PAMAM G3 w celu otrzymania najefektywniejszego nośnika leków przeciwnowotworowych, o tyle kolejne prace (V-X) dotyczyły zastosowanie tych dendrymerów jako transporterów różnych leków.

Pierwszym z tych leków była doksorubicyna. Koniugat dendrymeru z doksorubicyną opisany w pracy V jest zdaniem Habilitanta bardzo trwały, nie jest zatem postulowane uwalnianie leku w komórce. Nie do końca przekonuje wyjaśnienie mechanizmu działania koniugatu zawarte w Autoreferacie („*Wielowartościowy koniugat dostarcza większą ilość leku do pojedynczej komórki niż monowalentny odpowiednik, dlatego efekt terapeutyczny może być znacznie silniejszy*”) w świetle znanego mechanizmu działania doksorubicyny. Inną sprawą jest ocena, czy faktycznie efekt terapeutyczny jest silniejszy. Nie pomaga w tym sposób prezentacji wyników w artykule, który skupia się na porównaniu toksyczności koniugatu i nośnika (Fig. 3-Fig. 6). Znacznie bardziej celowe byłoby zaprezentowanie wyników porównujących działanie koniugatu i wolnej doksorubicyny. Do tego aspektu odnosi się Tabela 1. Z zaprezentowanych w Tabeli 1 wartości IC_{50} Habilitant wnioskuje, że koniugat był 2,7-4,5 razy bardziej toksyczny. Jeśli do wyznaczenia IC_{50} posługiwano się stężeniem koniugatu (a tak można rozumieć Tabelę 1), to nie należy zapominać, że jedna cząsteczka dendrymeru zawierała cztery cząsteczki doksorubicyny.

W kolejnych pracach Habilitant skoncentrował się na dostarczaniu do komórek glejaka (U-118 MG), raka płaskonabłonkowego (SCC-15), prawidłowych fibroblastów (BJ)

i unieśmiertelnionych ludzkich keratynocytów (HaCaT) dwóch związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym: celekoksybu i F-moc-L-Leucyny. Testowano kilka układów, tj. koniugat z przyłączoną 1 cząsteczką biotyny i 31 cząsteczkami celekoksybu, 1 cząsteczką biotyny i 31 cząsteczkami F-moc-L-Leucyny oraz z 1 cząsteczką biotyny, 16 cząsteczkami celekoksybu i 15 cząsteczkami F-moc-L-Leucyny. W pracy skupiono się głównie na porównaniu efektu stosowanych koniugatów na różne linie komórkowe. Zastosowanie koniugatu z F-moc-L-Leucyny zwiększyło efekt toksyczny wolnej F-moc-L-Leucyny (z wyjątkiem linii SCC-15), podczas gdy koniugowanie celekoksybu nie dało oczekiwanego efektu (z wyjątkiem linii BJ, gdzie obserwowano zwiększenie cytotoksyczności). Zastosowanie koniugatu z 16 cząsteczkami celekoksybu i 15 cząsteczkami F-moc-L-Leucyny dało efekt addycji. Ten koniugat był następnie wnikliwiej badany w odniesieniu do ścieżek związanych z COX-2 i PPAR γ (praca VII). Wykazano, że przeciwnowotworowa aktywność koniugatu zależała od poziomu białka COX-2, nie była zaś związana z ekspresją PPAR γ i nie zależała od mutacji w genie p53. Ten wynik skłonił Habilitanta do skoncentrowania się na celekoksybie i jego koniugacie z biotynylowanym dendrymerem w pracy VIII. Modelem badawczym w tej pracy były komórki glejaka U-118 MG i *C. elegans* w badaniach *in vivo*. Wykazano silniejszy efekt toksyczny dla koniugatu niż dla wolnego celekoksybu, niemniej należy pamiętać, że efekt ten odnoszono do stężenia dendrymeru skoniugowanego z celekoksybem, nie przeliczając wartości na stężenie celekoksybu w układzie. Podobne podejście zastosowano w badaniach *in vivo*.

Cykl prac tworzących rozprawę habilitacyjną zamykają dwa artykuły, których przedmiotem badań jest inhibitor COX-2 – nimesulid. W pracy IX powrócono do linii komórek raka płaskonabłonkowego SCC-15, jako kontrolę zastosowano linię BJ. Celem było znalezienie takiego układu, który byłby najbardziej toksyczny dla linii nowotworowej i najmniej toksyczny dla linii kontrolnej. Takim układem okazał się koniugat zawierający 18 cząsteczek nimesulidu. Zastanawia powód, dla którego Habilitant zawsze w swych badaniach stosuje ukierunkowaną cząsteczkę biotyny przyłączoną do koniugatu. W pracy VI Habilitant wykazał przecież, że komórki linii BJ charakteryzowały się wydajniejszym dkomórkowym transportem biotyny niż komórki linii SCC-15. W ostatniej pracy (X) badano megamer zbudowany z hydroksylowanego PAMAM G3, do którego przyłączono 12 cząsteczek dendrymeru PAMAM G0 posiadających na powierzchni dwie cząsteczki nimesulidu. Habilitant w tej pracy wykazał, że megamer efektywnie wnika do komórek BJ, SCC-15 i U-118 MG oraz jest najbardziej toksyczny dla linii SCC-15.

Podsumowując, przedstawiony do oceny cykl prac wskazuje, że Habilitant bardzo sprawnie porusza się w obszarze badań *in vitro*, stosując szeroki panel metod, który w ostatniej pracy poszerzył o badania *in vivo* z użyciem *C. elegans*. Na podkreślenie zasługują kompetencje Habilitanta w zastosowaniu technik mikroskopii konfokalnej. Dziwi konsekwencja z jaką Habilitant pracuje nad tym samym zestawem linii komórkowych, nie próbując chociażby zastosować komórek charakteryzujących się licznymi receptorami biotyny. Na usprawiedliwienie Habilitanta należy przypomnieć, że duża część pracy została wykonana w ramach grantu NCN. Być może wierność zaplanowanym zadaniom badawczym pozbawiła Habilitanta elastyczności, tak potrzebnej przy planowaniu badań.

Ocena dorobku naukowego i współpracy międzynarodowej po uzyskaniu stopnia doktora

Na dorobek dr. Łukasza Urama (do momentu złożenia wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego) składa się 28 artykułów, z czego 26 opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora. 10 z tych prac weszło w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym. Wszystkie prace Habilitanta do 26 maja 2021 r. były cytowane (bez uwzględnienia autocytowań) 158 razy.

W 2015 r. dr Łukasz Uram uzyskał finansowanie z Narodowego Centrum Nauki w konkursie SONATA-7. Kierowanie grantem pt. „Inhibitory COX-2 i/lub agoniści PPAR gamma sprzężone z dendrymerami PAMAM G3 ukierunkowanymi do komórek nowotworowych. Biologiczne właściwości i lokalizacja in vitro” zaowocowało aż 15 publikacjami, z czego 8 prac weszło w skład osiągnięcia habilitacyjnego.

Habilitant jest aktywnym naukowcem stale poszukującym nowych tematów. Na podkreślenie zasługuje Jego chęć ciągłego rozwijania warsztatu badawczego. Szczególnie od 2017 r. daje się zauważyć duże zintensyfikowanie aktywności publikacyjnej.

Dr Łukasz Uram pracując na Politechnice Rzeszowskiej nawiązał kilka cennych współprac z innymi ośrodkami w kraju, które zaowocowały publikacjami. W 2018 r. dołączył do utworzonego przy Narodowym Centrum Badań Jądrowych w Świerku Konsorcjum na Rzecz Terapii Borowo-Neutronowej. Współpracował z dr hab. Moniką Stompor-Gorący z Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego badając przeciwnowotworową aktywność flawonoidów. Od 2017 r. współpracuje z dr hab. Magdaleną Dąbrowską z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. Marcelego Nenckiego w Warszawie w projekcie dotyczącym molekularnych mechanizmów starzenia.

Dr Łukasz Uram trzykrotnie wygłaszał referaty na konferencjach naukowych, w tym raz na zaproszenie organizatorów (Koło Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej).

Dorobek naukowy dr. Łukasza Urama charakteryzuje się ubogą współpracą międzynarodową. Jedynym jej przejawem jest realizacja badań w ramach Akcji COST CM1407 pt. „Challenging organic syntheses inspired by nature – from natural products chemistry to drug discovery” wspólnie z zespołem prof. Bruno Botta z Uniwersytetu Sapienza w Rzymie. W okresie całej kariery naukowej dr Łukasz Uram nie odbył ani jednego zagranicznego stażu naukowego (krótko, bądź długoterminowego), bo trudno za taki uznać trzydniowy pobyt na Uniwersytecie w Belgradzie w ramach Training School organizowanej przez Akcję COST. Dobrze, że Habilitant ma świadomość korzyści płynących z długoterminowej mobilności i deklaruje chęć odbycia stażu zagranicznego po wygaśnięciu trwającej obecnie pandemii.

Ocena pracy dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej

Dr Łukasz Uram jest mocno zaangażowany w pracę dydaktyczną. Na Politechnice Rzeszowskiej prowadził liczne ćwiczenia, laboratoria, seminaria i wykłady. Szczególnie należy podkreślić prowadzenie wykładów z wielu przedmiotów (tj. mikrobiologii przemysłowej, fizjologii człowieka, podstaw biotechnologii leków, zaawansowanych technik mikroskopowych, technologii diagnostycznych i analitycznych wspomagających inżynierię

medyczną). Dr Łukasz Uram był promotorem aż 17 prac inżynierskich i 16 prac magisterskich na Politechnice Rzeszowskiej oraz kilkunastu prac licencjackich i magisterskich w Wyższej Szkole Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie. Habilitant pełnił też funkcję promotora pomocniczego w dwóch przewodach doktorskich: dr Magdaleny Szuster-Głuszcak (obrona w 2018 r.) i mgr Joanny Markowicz (obrona planowana w 2022 r.).

Dr Łukasz Uram wykazał się również działalnością organizacyjną. Po zatrudnieniu w Katedrze Biochemii i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej uruchomił Laboratorium Hodowli Komórek w oddziale zamiejscowym Politechniki Rzeszowskiej w Albigowej. Jest opiekunem Koła Naukowego Studentów Biotechnologii „Insert” działającego na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej. Działalność Koła skupia się na popularyzacji wiedzy biologicznej i biotechnologicznej wśród dzieci i młodzieży szkolnej. Koło naukowe wspólnie z firmą ADAMED realizuje program naukowo-edukacyjny popularyzujący wiedzę biotechnologiczną.

Wniosek końcowy

Dorobek naukowy dr. Łukasza Urama wchodzący w skład osiągnięcia habilitacyjnego jest obszerny liczebnie. Podtrzymuję moje zastrzeżenia dotyczące włączenia do tego osiągnięcia prac I-III, ze względu na trudność w ocenieniu indywidualnego wkładu Habilitanta w te prace. Niemniej, uważam że prace IV-X, które nie są obarczone tą wadą, stanowią wystarczający wkład w rozwój dyscypliny. Bez wątpienia Habilitant jest aktywnym pracownikiem naukowym, podejmującym różnorodną tematykę, dobrze odnajdującym się we współpracy z innymi zespołami. Mankamentem Jego dorobku naukowego jest skromna współpraca międzynarodowa i skoncentrowanie przeważającej części aktywności naukowej w macierzystej jednostce, którą od 2013 r. jest dla Habilitanta Politechnika Rzeszowska. Natomiast należy docenić rosnącą po 2017 roku liczbę publikacji i wzrastającą liczbę ich cytowań. Nie budzi też zastrzeżeń zaangażowanie dr. Łukasza Urama w proces kształcenia studentów i doktorantów. Biorąc powyższe pod uwagę, stawiam wniosek o uznanie osiągnięcia naukowego i dorobku naukowego dr Łukasza Urama za odpowiadające wymogom art. 219 ust. 1 pkt 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o nadanie Panu dr. Łukaszowi Uramowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

B. Klajnt - Maculewicz