

UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

Kierownik: dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.

Dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.
Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej
ul. Borowska 211A
50-556 Wrocław

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Edyty Wysokińskiej pt.:

Mechanizm Toksyczności nanocząstek lantanowców wobec wybranych komórek układu odpornościowego.

Promotor: dr hab. Wojciech Kalasa

Nanotechnologia znajduje zastosowanie w medycynie, w farmacji m.in. w transportowaniu leków, wykrywaniu i hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych czy w diagnostyce obrazowej. Obok wielu korzyści wynikających z zastosowań nanotechnologii, istnieją również pewne zagrożenia związane np. z toksycznością stosowanych nanomateriałów. Dotychczasowe badania koncentrują się przede wszystkim na ekspozycji właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwnowotworowych nanocząsteczek. Niestety, pomimo wielu badań, tylko niewiele grup badawczych skoncentrowało się na ocenie toksyczności nanomateriałów, szczególnie względem komórek prawidłowych, w tym komórek układu immunologicznego. W tym wysoce aktualnym, ważnym i interesującym nurcie kontrowersji naukowej osadzona jest rozprawa mgr inż. Edyty Wysokińskiej. Jej celem było poznanie mechanizmów toksyczności niepołączonych nanocząstek fluorku gadolinu domieszkowanego jonami lantanowców wobec wybranych komórek układu odpornościowego.

Cel badawczy jakiego podjęła się Doktorantka jest w pełni uzasadniony i ważny, Nanomateriały są szeroko stosowane w biomedycynie.

Przedłożona mi do oceny rozprawa pt.: „*Mechanizm toksyczności nanocząstek lantanowców wobec wybranych komórek układu odpornościowego*” liczy 103 strony i ma klasyczny, typowy dla tego typu rozpraw układ. Składa się ze spisu treści, streszczenia



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

Kierownik: dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.

w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów oraz rozdziałów: *Wprowadzenie, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski*. Skróty utworzone są w oparciu o nazwy angielskie. Bardziej korzystne byłoby tworzenie skrótów wynikających z nazewnictwa polskiego np.: nie ROS (reactive oxygen species) tylko RFT (reaktywne formy tlenu) i TK (tomografia komputerowa) a nie CT (computed tomography). Praca pisana jest w języku polskim a nie w angielskim, zatem wymaga polskiego słownictwa. Streszczenie umieszczone na początku dysertacji znacznie ułatwia recenzentowi ocenę dalszych rozdziałów pracy.

We *Wprowadzeniu* Doktorantka opisuje właściwości nanomateriałów, możliwość modyfikacji ich powierzchni, omawia właściwości materiałów upkonwertujących testowanych do zastosowań biomedycznych. We *Wprowadzeniu* mgr inż. Edyta Wysokińska przedstawia oddziaływanie nanomateriałów z komórkami i opisuje drogi wnikania nanomateriałów do wnętrza komórki, wskazując jednocześnie miejsca ich akumulacji w komórce. Ponadto opisuje jakie uszkodzenia organelli komórkowych mogą być indukowane przez badane związki i wynikające z tych uszkodzeń drogi apoptozy i indukcję autofagii. Na podstawie najnowszej literatury omawia toksyczność lantanowców *in vitro* i ekspozycje organizmów żywych na metale ziem rzadkich. Do tej części pracy nie mam uwag. Jest ona dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy. Dodatkowo część opisowa *Wprowadzenia* jest poparta licznymi rycinami pozwalającym na lepsze zrozumienie przedstawionych zagadnień.

W rozdziale *Cel pracy* autorka krótko uzasadnia podjęte przez nią badania i formułuje jasno sprecyzowany cel. Cel pracy jaki wyznaczyła sobie doktorantka jest właściwy.

Material i metody doktorantka opisuje poprawnie ale nie do końca precyzyjnie i jasno. W podrozdziale 3.1 Doktorantka nie przedstawiła przebiegu syntezy nanocząstek, jak również nie wymienia rodzaju nanomateriałów użytych do badań, co w znaczny sposób utrudnia późniejszą analizę wyników. Uważam to za niewłaściwe. Doktorantka używa zamiennie nazwy nanocząstki i nankryształy. Warto byłoby wyjaśnić, że nie wszystkie nanocząstki mogą być nankryształami. Te badane przez doktorantkę akurat mają właściwości nanokryształów. W podrozdziale 3.2 doktorantka używa sformułowania „komórki adherentne były zbierane



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

Kierownik: dr hab. Jolanta Sączko, prof. nadzw.

przy pomocy roztworu trypsyny”. Myślę, że powinno być „...były odklejane od podłoża przy użyciu roztworu trypsyny”. Można to jednak potraktować, jako skrót myślowy. W podrozdziale 3.3 Doktorantka przedstawia jedynie w sposób schematyczny przebieg przeprowadzonych doświadczeń. Wydaje mi się, że należałoby opisać przebieg prowadzonych doświadczeń, a ewentualnie dodatkowo zilustrować za pomocą schematów. Według mnie, taki schematyczny sposób przedstawienia realizowanych doświadczeń jest bardzo skrótowy, niepełny i nieczytelny.

Dobrze byłoby w tytułach podrozdziałów podać tak jak w podrozdziale 3.4 „Ocena żywotności/aktywności metabolicznej komórek metodą MTS (test MTS) w pozostałych rozdziałach Ocena np.: proliferacji komórek.....metodą taką i taką. To znacznie ułatwiłoby recenzentowi ocenę doboru właściwych metod i materiałów.

Pomimo tych uwag stwierdzam, że zastosowane metody badawcze, opisane w pracy przez Doktorantkę, zostały dobrane adekwatnie do postawionego sobie celu badań. Jednak co do doboru materiału mam pewne wątpliwości. Proszę, żeby Doktorantka uzasadniła, w jakim celu przebadala cytotoksyczność nanocząstek względem tyłu ludzkich linii komórek prawidłowych i nowotworowych, porównując uzyskane wyniki z mysimi makrofagami i fibroblastami. Porównanie oddziaływania badanych nanocząstek na ludzkie i mysie makrofagi nie jest do końca uzasadnione, ze względu na nieco odmienny mechanizm odpowiedzi immunologicznej, o czym doktorantka pisze w rozdziale „*Dyskusja*”.

Przeprowadzone badania przyniosły interesujące wyniki. „*Wyniki*” przedstawiono w postaci wykresów i tabel, które są jasne i nie budzą zastrzeżeń. Doktorantka w części „*Wyniki*” zamieściła 38 rycin (w tym wykresy i fotografie) i 11 tabel jako dokumentację wykonanych prac oraz ich omówienie. Bardzo dobra jakość przedstawionej dokumentacji świadczy, że doktorantka w sposób biegły posługuje się stosowanymi w rozprawie metodami i swobodnie korzysta z aparatury badawczej.

W tej części dysertacji Doktorantka wykazała wysoką toksyczność badanych, niepołączonych nanocząstek fluorku gadolinu domieszkowanego jonami lantanowców względem aktywnych mysich makrofagów. Doktorantka dowiodła, że nanocząstki wnikaące



UNIwersytet Medyczny IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU


Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej

Kierownik: dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.

do makrofagów wpływały na wzrost zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego makrofagów, co w istotny sposób zaburzało homeostazę mitochondrialną i proces autofagii. Wynikiem tych zaburzeń była aktywacja zależnej od kaspaz apoptozy. Warto wspomnieć, że regulacja apoptozy i autofagii na poziomie molekularnym często zachodzi z udziałem tych samych białek. Można zatem w aspekcie śmierci komórkowej wyróżnić trzy typy interakcji między apoptozą i autofagią. Możemy przypuszczać, że w przypadku badanych makrofagów, traktowanych nanocząsteczkami, domieszkowanymi jonami lantanowców mamy do czynienia z interakcją, w której autofagia nie prowadzi do śmierci komórek ale pośredniczy w indukcji apoptozy. Istotne i nowatorskie jest krótkie podsumowanie każdego podrozdziału tej części rozprawy, które ma na celu zebranie cząstkowych wyników z przeprowadzonych doświadczeń. Szkoda tylko, że Doktorantka umieszcza w rozdziale „Wyniki” to co powinno być opisane w rozdziale „Materiał i Metody”.

Kolejny rozdział pracy to „Dyskusja”, która stanowi 8-stronicowe omówienie uzyskanych wyników na tle danych literaturowych. Doktorantka na początku jeszcze raz podkreśla, co miały na celu przeprowadzone badania i omawia po kolei rezultaty przeprowadzonych doświadczeń odnosząc się do informacji pochodzących z prac innych badaczy. W tej części rozprawy Doktorantka umieszcza na dwóch ostatnich stronach dwie ryciny, w których zestawia swoje badania z badaniami innych autorów, przedstawiające mechanizmy toksyczności niepołączonych nanocząstek zawierających w swej strukturze lantanowce. Uważam to za ciekawe porównawcze przedstawienie badań Doktorantki z badaniami innych autorów. Moje uwagi nie rzutują na wysoką wartość przedłożonej mi do recenzji.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pt.: „Mechanizm toksyczności nanocząstek lantanowców wobec wybranych komórek układu odpornościowego” spełnia wymogi określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r.o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz. 595, z póź.zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu im. Ludwika Hirszfelda o dopuszczenie Pani mgr inż. Edyty Wysokińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ
I KOMÓRKOWEJ
kierownik

dr hab. Jolanta Saczko, prof. nadzw.