



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Zakład Biotechnologii

15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1

Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-57-18

aniabiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska

Białystok, 15. 05. 2022

Ocena pracy doktorskiej mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz

pt. „Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej”

Pojęcie nanotechnologia pojawiło się już na początku minionej dekady. W 1959 r. noblista Richard Feynman. na zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Fizyków w referacie „There is plenty of room at the bottom” przedstawił prognozę, że rozwój nauki umożliwi konstruowanie sztucznych struktur złożonych z pojedynczych atomów. Obecnie nanotechnologia -rozwijającą się interdyscyplinarną nauka, scala osiągnięcia z dziedziny chemii, fizyki i informatyki, otwierając nowe możliwości poznawcze, prowadząc nas w stronę sterowania strukturą materii na poziomie pojedynczych atomów i molekuł. Rozwój nanotechnologii otwiera różnorodne możliwości aplikacyjne, w szczególności pożądane w ochronie zdrowia i ekologii. Jak wynika z doniesień literaturowych, wśród najbardziej popularnych nanostruktur stosowanych w medycynie oraz w kosmetologii, oprócz znanych i często stosowanych nanocząstek srebra i złota, coraz częściej wykorzystuje się nanocząstki innych metali bloku d, m.in. takich jak platyna, pallad czy ruten.

Od 2006 prowadzony jest Project on Emerging Nanotechnologies przeznaczony do tworzenie spisu wszystkich nanoproduktów konsumenckich dostępnych na rynku światowym. Obecnie na rynku światowym obserwujemy ponad 1400 nanoproduktów, z których ponad połowa znajduje zastosowanie w obszarze zdrowia i fitness. Stale jednak powinniśmy mieć na uwadze, że wprowadzanie nowych materiałów do naszego środowiska wymaga ich oceny pod kątem potencjalnych zagrożeń związanych z ich kumulacją w naszym otoczeniu. Obserwujemy wzrost liczby badań naukowych skupionych na ocenie toksyczności nowych nanomateriałów, gdyż ciągle niewiele jest potwierdzonych naukowo danych na temat wywoływania przez nanocząstki i nanomateriały skutków toksycznych u ludzi i zwierząt. Brak jest również

regulacji prawnych, które normowałyby projektowanie, wytwarzanie i końcowe wykorzystywanie produktów nanometrycznych. W celu bezpiecznego stosowania zaawansowanych nanotechnologii, konieczne jest zintensyfikowanie badań w kierunku kompleksowego wpływu nanoobjektów zarówno na zdrowie człowieka, jak i na nasze środowisko naturalne.

W świetle przytoczonych faktów wybór tematu pracy doktorskiej mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz pt. „Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej” jest istotny, aktualny i interesujący, o dużych walorach praktycznych. Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: wstęp, materiał badawczy, cele pracy, materiały i metody, wyniki, podsumowanie, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis rycin i tabel i piśmiennictwo. Rozprawa doktorska mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz liczy 153 strony tekstu, w których zawartych jest 21 rycin i 49 tabel. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Doktorantka posługuje się zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Piśmiennictwo liczy 155 pozycji literaturowych, obejmuje publikacje z ostatnich lat i jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorantka wprowadza czytelnika w świat nanotechnologii przedstawiając informacje naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autorka omawia zagadnienia dotyczące charakterystyki, zastosowania i wchłaniania nanocząstek srebra i złota. Druga część wstępu dotyczy wybuchu oddechowego, zaś trzecia część odnosi się do procesu pyroptozy. Wstęp pracy doktorskiej jest dobrym wprowadzeniem czytelnika do dalszej części dysertacji.

Celem pracy doktorskiej mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz pt. „Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej” było zbadanie wpływu nanocząstek srebra i złota w zależności od ich rodzaju, stężenia i czasu inkubacji na aktywność wybuchu oddechowego oraz na proces pyroptozy monocytów i granulocytów krwi ludzkiej. Do badań wykorzystano ludzką heparynizowaną pełną krew obwodową, pozyskaną od 120 potencjalnie zdrowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Poznaniu. Wpływ badanych nanocząstek srebra i złota na indukcję procesu pyroptozy monocytów i granulocytów zbadano poprzez pomiar aktywności kaspazy-1 oraz stężenia interleukiny-1 β .

Kuliste nanocząstki złota zostały otrzymane zmodyfikowaną metodą Turkevicha. Opis syntezy kulistych nanocząstek złota został przedstawiony w załączniku 2. Synteza prętopodobnych nanocząstek złota została przeprowadzona metodą *in situ bottom-up* (załącznik

3). Kuliste nanocząstki srebra przygotowano zgodnie z artykułem: Bigall, N., Reitzig, M., Naumann, W., Simon, P., van Pée, K.-H. and Eychmüller, A. Fungal Templates for Noble-Metal Nanoparticles and Their Application in Catalysis (załącznik 4). Przeprowadzona charakterystyka otrzymanych nanostruktur metodą spektroskopową (w obszarze UV-Vis) i mikroskopową (wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego, HRTEM, ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) umożliwiły wyznaczenie kształtu i rozmiaru kulistych nanocząstek złota i srebra. Syntezę, funkcjonalizację oraz badania fizykochemiczne użytych w pracy nanocząstek, w tym widma UV-VIS dołączone w opisie zastosowanych nanocząstek przeprowadzono w Zakładzie Fizyki Molekularnej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej oraz Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu. Pomiary mikroskopowe – morfologię oraz wymiary nanocząstek wykonano przy pomocy wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM) (JEOL ARM-200F) w Centrum NanoBiomedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Doktorantka w swoich badaniach zastosowała następujące nanocząstki: Au1- kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=525$ nm zawieszane w wodzie. Au2 - kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=525$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 200) zawieszane w wodzie. Au3- kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=526$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 2000) zawieszane w 0,9% NaCl. Au4- prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=683$ nm zawieszane w wodzie. Au5- prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=685$ nm sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 2000) zawieszane w wodzie. Au6- prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=685$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 2000) zawieszane w 0,9% NaCl oraz Ag- kuliste nanocząstki srebra o rozmiarze 8,5 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=397$ nm zawieszane w buforze. W pracy doktorskiej o ile przedstawiony opis badań eksperymentalnych nie budzi większych zastrzeżeń to jednak Recenzentka nie znalazła informacji jaki bufor zastosowano do sporządzenia roztworów nanocząstek srebra. Rodzi się także pytanie: dlaczego nie zastosowano tutaj jako rozpuszczalnika wody, czy soli fizjologicznej, jak to miało miejsce w przypadku nanocząstek złota?

Aktywność wybuchu oddechowego została zmierzona przy pomocy cytometru przepływowego z wykorzystaniem komercyjnego testu Phagoburst, który zawiera 12-mirystynian 13-octanu forbolu (PMA) będący silnym środkiem stymulującym wybuch oddechowy, a także dihydrorodaminę 123 (DHR) użytą, jako fluorogeniczny substrat. Granulocyty i monocyty stymulowane PMA wytwarzają reaktywne formy tlenu. Reaktywne formy tlenu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, pełnią rolę przekaźników sygnału, regulują procesy naprawcze w komórkach i ekspresję genów, biorą udział w reakcjach redoks w łańcuchu oddechowym, odtwarzaniu związków wysokoenergetycznych (ATP), transporcie tlenu przez hemoglobinę, ponadto aktywują cytochrom P450 i fagocytozę drobnoustrojów. Reaktywne formy tlenu mogą jednak wywierać działanie szkodliwe, nadmiar RFT powoduje stan permanentnego stresu oksydacyjnego prowadzącego do uszkodzenia składników komórki i zaburzenia jej funkcji, poprzez m.in. utlenianie związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian), degradację kolagenu, depolimeryzację kwasu hialuronowego, utlenianie hemoglobiny, inaktywację enzymów i białek transportowych, uszkodzenia DNA, peroksydację lipidów błon komórkowych, rozpad erytrocytów i zmiany morfologii komórek. Liczni autorzy dowodzą, że nanocząstki wpływają także na indukcję stresu oksydacyjnego i zachwianie równowagi redox komórek.

Autorka dysertacji przeprowadziła ilościową ocenę zmian aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów krwi ludzkiej pod wpływem nanocząstek kulistych i prętopodobnych złota oraz kulistych nanocząstek srebra. Doktorantka zastosowała dwa czasy inkubacji nanocząstek we krwi: 30 i 60 minut w stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka stwierdziła bardzo małe różnice w wartościach średniej intensywności fluorescencji rodaminy wśród zarówno granulocytów, jak i monocytów bez stymulacji PMA, między wszystkimi próbkami inkubowanymi zarówno z nanocząstkami złota, jak i srebra w porównaniu do próby kontrolnej. Natomiast po stymulacji PMA nanocząstki złota (szczególnie kuliste nanocząstki Au_3 sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym PEG 2000) powodowały wzrost średniej wartości fluorescencji, głównie w granulocytach. Uzyskane wyniki nie w pełni pokrywają się z danymi literaturowymi, co sama Doktorantka przyznaje w swojej rozprawie doktorskiej. Zdaniem Recenzentki w tym miejscu należałoby podjąć dyskusję naukową tłumaczącą rozbieżność uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. Mam nadzieję, że w trakcie publicznej obrony pracy Doktorantka ustosunkuje się do tego zagadnienia. W tabelach 7, 8 czy 43 próbki są oznaczona jako „bufor do Au”, pojawia się pytanie, czy są to próby kontrolne?

Nanocząstki srebra, szczególnie w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ przy czasie inkubacji 60 min, powodowały spadek intensywności fluorescencji granulocytów po stymulacji PMA, co jest zgodne z wynikami badań innych naukowców. W kolejnym etapie badań Doktorantka oceniła wpływ nanocząstek srebra i złota Au³ (kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 2000) zawieszane w 0,9% NaCl) i Au⁶ (prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG 2000) zawieszane w 0,9% NaCl) na indukcję procesu pyroptozy monocytów i granulocytów krwi ludzkiej poprzez cytometryczny pomiar aktywności kaspazy-1 oraz pomiar stężenia interleukiny-1 β metodą immunoenzymatyczną.

Proces pyroptozy jest typowy dla makrofagów, jednak może dotyczyć również komórek po zakażeniu bakteriami, wirusami, uszkodzeniami wywołanymi przez czynniki fizyczne czy po długotrwałej terapii cytostatykami. Funkcją kaspazy-1 w pyroptozie jest przekształcanie nieaktywnych proform cytokin prozapalnych (IL-1 β i IL-18) do aktywnych czynników, w wyniku czego pojawia się stan zapalny, który w zdecydowany sposób odróżnia pyroptozę od apoptozy. Interleukina 1 β wpływa na pobudzenie migracji leukocytów oraz aktywuje dodatkowo panel cytokin i chemokin działających wielokierunkowo podczas rozwoju stanu zapalnego. Z kolei IL-18 aktywuje limfocyty T oraz makrofagi do produkcji IFN- γ , IL-1 α , IL-6 oraz TNF- α , które utrzymują lokalny stan zapalny.

W swoich badaniach Doktorantka wykazała spadek odsetka komórek pyroptotycznych zarówno w monocytach, jak i w granulocytach pod wpływem nanocząstek srebra, w porównaniu z próbą kontrolną. Uzyskane wyniki badań nie korelują z doniesieniami literaturowymi innych autorów. W próbach inkubowanych z nanocząstkami srebra, procent komórek pyroptotycznych był nieco niższy (od 2,95% do 3,99%) niż w próbach kontrolnych (4,31%). Wyjątkiem były próby granulocytów inkubowanych przez 60 min z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$, gdzie stwierdzono 8,85% \pm 20,53 komórek pyroptotycznych. Wysoka wartość odchylenia standardowego, rodzi pytanie o statystyczne znaczenie tych wyników. Ponadto, czy sumaryczna ilość komórek prawidłowych i pyroptotycznych w każdej próbie nie powinna wynosić 100% (tabela 36)? Potwierdzono korelację pomiędzy spadkami aktywności kaspazy-1 i IL-1 β . Obserwowano spadek stężenia interleukiny-1 beta w porównaniu z próbą kontrolną przy 24-godzinnej inkubacji z nanocząstkami srebra. Największy spadek stężenia IL-1 β występował w próbkach, do których dodano nanocząstki Ag w stężeniu 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Wykazano różnice istotne statystycznie dla wszystkich użytych stężeń w porównaniu z próbą kontrolną. Proszę o dyskusję podczas obrony pracy doktorskiej nad

stwierdzeniem ze str. 124 „Obserwowany w badaniach brak wzrostu w aktywności kaspazy-1 i stężenia interleukiny-1 β odbiegają od danych literaturowych. Brak użycia LPS (lipopolisacharydu) będącego bodźcem prozapalnym i prowadzącym do wytwarzania IL-1 β , może tłumaczyć, dlaczego w badaniach własnych nie zaobserwowano wzrostu stężenia IL-1 β .”

W badaniach przedstawionych w recenzowanej pracy doktorskiej we wszystkich próbach granulocytów, jak również granulocytów inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au³ występował niewielki wzrost odsetka komórek wykazujących pyroptozę, w porównaniu z próbą kontrolną. Nanocząstki złota Au³ oraz Au⁶ inkubowane przez 24-godziny z krwią w niewielkim stopniu powodowały wzrost stężenia interleukiny-1 β w porównaniu z próbami kontrolnymi. Chciałabym, aby Doktorantka podjęła dyskusję, czy nie należałoby zbadać wpływu badanych nanocząstek na stężenie interleukiny IL-18, która odgrywa ogromną rolę w procesie pyroptozy? Przygotowując pracę do druku, czy nie warto zastanowić się, nadrozpatrzeniem innych rodzajów śmierci, czy nie należało zrobić np. badania cytometrycznego z Aneksyną V i jodkiem propidyny?

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka przeprowadziła analizę uzyskanych wyników oraz dokonała konfrontacji badań własnych z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Praca doktorska mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz zdaniem recenzentki ma charakter nowatorski i wnosi istotny wkład w badania nad nanocząstkami srebra i złota.

Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie, np. str. 19 „jednoelektrodowa redukcja tlenu”, str. 73 tabela 16 - błędna kolejność stężenia i czasu inkubacji; str. 43 Autorka stwierdziła: „zmierzone zawiesinę komórkową”, co powtarza w wielu miejscach w swoim doktoracie (str. 45, 49, 51), oczekuję propozycji poprawy tego niefortunnego sformułowania. Na str. 43 znajdujemy określenie „laser wzburzający”, opis do wielu tabel jest na jednej stronie, a sama tabela z wynikami na stronie następnej, co znacznie utrudnia analizę wyników. Rozdział 1.2.2. nosi tytuł: „Porównanie w obrębie komórek wykazujących stan zapalny.” – proszę o komentarz o jakim stanie zapalnym mówimy? Na str. 61 niejasne jest sformułowanie „wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi”, czy rzeczywiście każde badanie powtarzano 22-krotnie? W paragrafie 2.4.2 dotyczącym opisu techniki immunoenzymatycznej ELISA, proszę o bardziej szczegółowe sprecyzowanie jaki „bufor” został wykorzystany w badaniu. Proszę o odniesienie się Doktorantki do następujących sformułowań: substrat enzymatyczny (str.38), preparat antygeny (str.52), brak zabarwienia wskazuje na brak enzymu (str.38). Stężenie interleukiny 1 β zostało zbadane za pomocą gotowego zestawu odczynników i wyniki przedstawione w formie statystyki opisowej. Recenzentka sugeruje, że lepszą formą przedstawienia wyników byłby w tym przypadku

wykres obrazujący średnią wartość stężenia i wartości p. Nasuwają się też dwa pytania metodyczne: w jakiej temperaturze przechowywano supernatant do oznaczenia IL-1 β oraz jaki był zakres stężeń krzywej standardowej? Doktorantka bardzo wnikliwie przeanalizowała wyniki badań pod kątem statystycznym. Zostały one przedstawione w 49 tabelach, w tym w większości są to statystyki opisowe. Należałoby zastanowić się, czy przynajmniej części wyników nie przedstawić w postaci wykresów, czy cytogramów. Dysertacja uzyskałaby wówczas większą czytelność i byłaby bardziej przejrzysta.

Wszystkie wcześniej wymienione uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Mgr Patrycja Anna Talarska-Markiewicz wykonała ogromną pracę eksperymentalną, badania przeprowadziła na 120 próbach krwi, zbadała 6 rodzajów nanocząstek złota, nanocząstki srebra przy zastosowaniu trzech stężeń i dwóch czasów inkubacji. Opracowanie merytoryczne, jak i statystyczne tak znacznej ilości wyników było wielkim wyzwaniem poznawczym. Przy szerokim stosowaniu nanocząstek metali w przemyśle, ochronie zdrowia, kosmetologii zachodzi pilna konieczność oceny ich wpływu na środowisko naturalne. W tym kontekście dysertacja mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz jest bardzo dobrym zaczynem takich badań.

Należy również podkreślić dorobek naukowy mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz, jest Ona jest współautorem 10 znaczących prac naukowych o wysokich współczynnikach oddziaływania IF, wynoszącym łącznie 11,565, 403 punktów MNiSW oraz sześciu komunikatów zjazdowych.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Patrycji Anny Talarskiej-Markiewicz pt. „Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852).

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
Anna Bielawska
prof. dr hab. Anna Bielawska