

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. nadzw. UR

Zakład Genetyki

Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Rzeszowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Mariusza Żuberka**

**pod tytułem**

**„Molekularne mechanizmy aktywności nanocząstek srebra na poziomie komórkowym”**

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr **Mariusza Żuberka** została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Grzegorza Bartosza oraz opieką promotora pomocniczego Pani dr Agnieszki Grzelak w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego. Praca doktorska została wykonana przy wsparciu finansowym pochodzącym z funduszy Narodowego Centrum Nauki, Projektu POIG oraz środków Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Na rozprawę doktorską Pana mgr Żuberka składa się cykl spójnych tematycznie prac opublikowanych w trzech bardzo dobrych czasopismach naukowych: Journal of Nanobiotechnology, Redox Biology oraz Mechanisms of Ageing and Development. We wszystkich trzech pracach Pan mgr Żuberek jest pierwszym autorem, z wiodącym niebudzącym zastrzeżeń recenzenta udziałem. Doktorant dołączył oświadczenia, w których opisał precyzyjnie swój wkład w powstanie prac wchodzących w cykl rozprawy doktorskiej, wskazując w nich na swój udział w wykonaniu eksperymentów, analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptów. Należy jednak zaznaczyć istotną pomoc promotora pomocniczego w powstaniu wszystkich publikacji, co wskazuje na autentyczne zaangażowanie Pani dr Grzelak w opiekę nad doktorantem podczas pracy laboratoryjnej.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzi ludzkich komórek nowotworu wątrobowo-komórkowego (HepG2) i ludzkiej linii komórek śródmózgowia (LUHMES) na nanocząstki srebra o średnicy nominalnej 20 nm. Rozprawa doktorska w szczególności koncentruje się na poznaniu roli aktywności metabolicznej komórek zależnej od stężenia glukozy, stresu oksydacyjnego, stresu nitrozacyjnego w determinowaniu cytotoksyczności nanocząstek srebra.

W związku z intensywnym rozwojem nanotechnologii w pełni uzasadnione jest stawianie pytań dotyczących zagrożeń, które się z nim wiążą. Tym samym zagadnienia związane z poznaniem mechanizmów toksyczności różnych nanomateriałów są wciąż przedmiotem wielu opracowań naukowych, a branżowe czasopisma, które zajmują się tą tematyką odznaczają się w większości bardzo wysokimi współczynnikami oddziaływania (tzw. Impact Factor).

Doktorant dokonał wyboru nanocząstek srebra jako obiektu swoich wieloletnich badań. W dostępnych bazach (m.in. PubMed) można znaleźć wiele opracowań naukowych poświęconych zagadnieniu toksyczności nanocząstek srebra, niemniej ich wyjątkowe właściwości fizyko-chemiczne, sposoby otrzymywania, potencjalne aplikacje oraz zagadnienia związane z biokompatybilnością są wciąż aktualne i warte badań.

Nanocząstki srebra są głównie otrzymywane dla przemysłu elektronicznego oraz chemicznego. Natomiast ich wyjątkowe właściwości fizyko-chemiczne związane są z dużym stosunkiem powierzchni aktywnej do objętości sprawiają, że mają one także zastosowanie w medycynie. Niezwykle ważną cechą nanocząstek srebra jest wykazywanie aktywności biologicznej nawet przy stosowaniu bardzo małych stężeń. Jedną z takich powszechnie wykorzystywanych aktywności nanocząstek srebra jest ich przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe działanie. W ostatnich latach na rynku medycznym pojawiły się także linie produktów opatrunkowych otrzymane z wykorzystaniem nanocząstek srebra, które charakteryzują się działaniem przeciwbakteryjnym i lepszą penetracją w głąb martwiczych tkanek. Dodatkowo ze względu na swoje unikalne właściwości przeciwbakteryjne nanocząstki srebra wykorzystuje się również w ortopedii, chirurgii szczękowo-twarzowej i chirurgii stomatologicznej. Stosowanie nanocząstek srebra postrzegane jest także jako jedna z alternatywnych metod zmierzających do ograniczenia stosowania antybiotyków oraz zapobiegania rozprzestrzenianiu różnych mikroorganizmów.

Dlatego poznanie jak najszerszego spektrum możliwych interakcji między nanomateriałami a komórkami organizmów jest niezwykle ważne dla wielu dziedzin gospodarki.

Rozprawa doktorska Pana mgr Żuberka zawiera następujące rozdziały: informacje wprowadzające z wykazem źródeł finansowania oraz wykazem dorobku naukowego doktoranta, streszczenie w języku polskim oraz angielskim obejmujące następujące



podrozdziały: wstęp, cele, metody, wyniki oraz wnioski, oświadczenia współautorów, załączone prace wchodzące w skład rozprawy.

„Wstęp” streszczenia rozprawy jest krótkim opracowaniem poświęconym głównie mechanizmom stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego. Pewnym mankamentem tego rozdziału w mojej ocenie jest brak zwięzłych, ale konkretnych informacji wskazujących zasadność: a) wyboru nanocząstek srebra jako przedmiotu badań, co jest w szczególności istotne ze względu na ilość dostępnych publikacji, m.in. na temat cytotoksyczności nanocząstek srebra, b) wyboru modeli komórkowych. W podrozdziale streszczenia zatytułowanym „Cel pracy” doktorant sprecyzował trzy cele szczegółowe. Należy jednak odnotować brak sformułowanego wyraźnego celu głównego pracy doktorskiej. W podrozdziale streszczenia zatytułowanym „Metody” doktorant opisał modele komórkowe oraz użyte metody w pracach wchodzących w skład rozprawy. Z kolei w podrozdziale streszczenia zatytułowanym „Wyniki” doktorant opisał syntetycznie wyniki otrzymane w trzech powiązanych tematycznie pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Końcowy podrozdział streszczenia zatytułowany „Wnioski” obejmuje sześć wniosków końcowych sformułowanych na podstawie otrzymanych wyników eksperymentalnych. W streszczeniu polskim należy wspomnieć o kilku zauważonych przez recenzenta niefortunnych sformułowaniach np. „przeźnictwa sygnałów” (str. 9), czy „stres azotowy” (str. 5) - poprawnym stosowanym sformułowaniem powinno być „stres nitrozacyjny”, „Zapostulowano” (str. 9). W pracy zauważono także błędy interpunkcyjne.

Analogiczny opis zaprezentowany w streszczeniu polskim został zawarty w streszczeniu angielskim, które dodatkowo zostało zakończone spisem literatury obejmującym jedynie 5 pozycji.

Pierwsza praca wchodząca w cykl rozprawy opublikowana w 2015 roku w Journal of Nanobiotechnology dotyczy mechanizmu toksyczności nanocząstek srebra zależnego od stężenia glukozy. Przeprowadzone badania na linii komórkowej HepG2 wykazały, że toksyczność nanocząstek srebra była wyższa w obecności wyższego stężenia glukozy. Doktorant zaobserwował także, że niższe stężenie glukozy stymulowało mechanizmy obrony antyoksydacyjnej na poziomie ekspresji niektórych genów, a także wzrostu aktywności enzymatycznej katalazy, S-transferazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej czy reduktazy glutationowej, co z kolei według doktoranta efektywnie chroniło komórki przed stresem wywołanym określonymi stężeniami nanocząstek srebra. Doktorant wysunął



hipotezę, iż obniżona ilość glukozy stymuluje proces fosforylacji oksydacyjnej, co skutkuje indukcją systemu obrony antyoksydacyjnej.

Proszę doktoranta o podanie uzasadnienia czym był podyktowany wybór linii komórkowej HepG2 do tej części badań. W ocenianej pracy zabrakło niestety kilku ważnych eksperymentów, które pozwoliłyby na lepsze uzasadnienie dla sformułowanej hipotezy. Według recenzenta w pracy zabrakło analizy oceny poziomu uszkodzeń mitochondriów przez nanocząstki srebra, np. poprzez analizę potencjału błony mitochondrialnej, a także podania różnic w produkcji ATP w komórkach w poszczególnych układach eksperymentalnych. Dlatego proszę o pełniejszy komentarz na jakiej podstawie doktorant stwierdził, że w jego układzie eksperymentalnym przy obniżonej glukozie w medium hodowlanym rzeczywiście następuje indukcja fosforylacji oksydacyjnej?

W drugiej pracy opublikowanej w 2017 roku w *Redox Biology* doktorant opisał zjawisko wzrostu nitracji białek wywołane egzogennym nadtlenoazotynem w komórkach HepG2 hodowanych w medium o obniżonym stężeniu glukozy. Doktorant wysunął hipotezę, iż nitrowane białka są szybciej usuwane w komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, co jest związane z większą aktywnością systemu ubikwityna-proteasom. Nanocząstki srebra dodane do medium z obniżoną zawartością glukozy według doktoranta wywoływały podobny efekt, tj. indukowały wzrost aktywności systemu ubikwityna-proteasom na drodze szlaku sygnałowego NRF2.

Proszę doktoranta o komentarz na jakiej podstawie twierdzi, że efektem działania nanocząstek srebra jest wzrost aktywności systemu ubikwityna-proteasom, ponieważ w załączonej publikacji nie ma danych eksperymentalnych na ten temat?

W ostatniej z cyklu trzech prac, opublikowanej w 2018 roku w *Mechanisms of Ageing and Development* doktorant w oparciu o model komórkowy ludzkiej linii komórek śródmózgowia LUHMES ocenił wpływ nanocząstek srebra na profil transkrypcyjny 32 genów kodujących białka transporterów ABC. Doktorant zaobserwował największe zmiany w transkryptomie genów z rodziny *ABCA*, między innymi dla genu *ABCA1*. Na tej podstawie doktorant zaproponował mechanizm, w którym internalizacja fragmentów błony bogatej w cholesterol towarzyszy endocytozie nanocząstek srebra, prowadząc do zwiększenia ogólnej puli cholesterolu w komórce dostępnego dla reaktywnych form tlenu. Doktorant stwierdził także, że komórki intensywnie proliferujące poddane działaniu nanocząstek srebra wykazują profil ekspresji mRNA dla białek ABC analogiczny do tego, który związany jest z procesem

różnicowania się w dojrzałe neurony dopaminergiczne. Świadczyć to może o tym, że stres wywołany przez nanocząstki w komórkach proliferujących może prowadzić do zaburzenia różnicowania w płodowych komórkach neuronalnych.

W związku z tym, iż doktorant w swojej pracy wnioski oparł wyłącznie o analizę profilu transkrypcji genów *ABC* proszę o komentarz dotyczący znanych mechanizmów regulacji potranskrypcyjnej genów w odpowiedzi na nanocząstki srebra.

#### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, pozytywnie oceniam przedstawioną pracę doktorską Pana mgr Mariusza Żuberka oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim. Wniosuję do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr Mariusza Żuberka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 25/04/2018

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. nadzw. UR

