

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Mariusza Żuberka**

**pt.: „Molekularne mechanizmy aktywności nanocząstek srebra  
na poziomie komórkowym ”**

Rozprawa doktorska mgr Mariusza Żuberka obejmuje cykl 3-ch powiązanych tematycznie publikacji o łącznym IF=14,370. Rozprawę doktorską otwierają informacje wprowadzające dotyczące źródła finansowania badań oraz podsumowujące dorobek naukowy Doktoranta. Sumaryczny IF dorobku publikacyjnego wynosi 34,124, jest więc doprawdy imponujący i stanowi wizytówkę poziomu naukowego Promotora – prof. dr hab. Grzegorza Bartosza. Promotorem pomocniczym jest Agnieszka Grzelak. Wstęp otwierający ocenianą rozprawę zawiera istotne informacje ogólne odnośnie Nanocząstek i mechanizmów stresu oksydacyjnego, dostarczając przesłanek do jasno zdefiniowanych celów badawczych oraz metod, po których następują podsumowanie wyników i wnioski końcowe. Doktorant, w zwięzły sposób omówił naturalne i antropogeniczne źródła Nanocząstek. Następnie skrótowo omówił biologiczne skutki aktywności tych niezwykle cząstek, tj. alergię, nowotwory, choroby układu sercowo-naczyniowego, immunotoksyczność, choroby neurodegeneracyjne i inne. Kolejno zdefiniował pojęcie stresu oksydacyjnego jako zaburzenie równowagi redox podkreślając istotną rolę zmian stężenia glukozy jako czynnika regulatorowego homeostazy redox.

Kluczowe szlaki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowego wydają się być regulowane przez status redoksy komórek, a reaktywne formy tlenu mogą aktywować czynniki transkrypcyjne. Aktywacja czynników transkrypcyjnych prowadzi do zmian profilu ekspresyjnego genów tj. NRF-2, który aktywuje geny zawierające w sekwencji regulatorowej element ARE. Wiele białek z nadrodziny ABC znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych wrażliwych na zmiany statusu redox komórek.

Cel główny dysertacji rozbity jest na 3 cele cząstkowe

- 1) Ocena endogennej generacji RFT zależnej od aktywności łańcucha oddechowego mitochondriów jako czynnika modulującego toksyczność nanocząstek srebra.
- 2) Ocena roli stresu azotowego w toksyczności nanocząstek srebra
- 3) Ocena wpływu wolnych rodników tlenowych generowanych przez nanocząstki w procesie modulacji profilu mRNA dla wybranych białek ABC w neuronach nieodróżnionych oraz dojrzałych neuronach dopaminergicznych

W opinii recenzenta tak zaprojektowane cele szczegółowe zostały zaprojektowane w sposób jasny i logiczny, a odpowiedzi na postawione cele recenzent znajduje w czytelnych wnioskach, które w pełni poparte zostały wynikami przeprowadzonych badań. Do realizacji celów rozprawy Doktorant wykorzystał 2 komórkowe modele badawcze. Lina HepG2 oraz LUHMES zakupione z ETCC

Na rozprawę doktorską składają się publikacje:

Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2. **Zuberek M**, Wojciechowska D, Krzyzanowski D, Meczynska-Wielgosz S, Kruszewski M, Grzelak A. *J Nanobiotechnology*. 2015 Oct 22;13:72. doi: 10.1186/s12951-015-0132-2. PMID:26493216

Silver nanoparticles can attenuate nitrate stress. **Zuberek M**, Paciorek P, Bartosz G, Grzelak A. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:646-652. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.011. Epub 2017 Jan 24. PMID:28157664

Exposure of human neurons to silver nanoparticles induces similar pattern of ABC transporters gene expression as differentiation: Study on proliferating and post-mitotic LUHMES cells. **Zuberek M**, Stępkowski TM, Kruszewski M, Grzelak A. *Mech Ageing Dev*. 2018 Apr;171:7-14. doi: 10.1016/j.mad.2018.02.004. Epub 2018 Feb 24. PMID:29486223

W dwóch pierwszych publikacjach cyklu Doktorant stwierdził iż zmiana stężenia dostępnej glukozy w medium komórkowym skutkowałą ustaleniem nowej równowagi redox. Komórki uzyskiwały ten stan po 72h ekspozycji na glukozę.

Recenzent z uznaniem ocenia zakres badań obejmujący wzrost aktywności katalazy (CAT), transferazy glutationu (GST), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz reduktazy glutationu (GR) świadczący o procesie adaptacji komórek do nowego stanu równowagi redox. Ponadto Doktorant dokonał analizy transkryptomu odpowiedzialnego za odpowiedź komórki na stres oksydacyjny. Zauważył zwiększoną ekspresję genów: NOS2, GSTM5, ALB, MBL2, SCRA3 i CAT. Jednocześnie zaobserwował obniżenie ekspresji genów związanych z metabolizmem glutationu, co sugeruje udział szybkich enzymatycznych reakcji detoksykujących reaktywne formy tlenu generowanych obniżeniem stężenia glukozy. Ciekawym osiągnięciem Doktoranta było wykazanie znaczenia zmian stężenia glukozy jako czynnika modulującego toksyczność nanocząstek srebra. Śmierć 10% komórek w obecności standardowych stężeń glukozy (25mM) wywoływały nanocząstki srebra w stężeniu 1,4 raz niższym niż w przypadku hodowli w medium o obniżonym stężeniu glukozy – (5,5mM).

Nanocząstki srebra indukowały wzrost poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach eksponowanych na wyższe stężenie glukozy. Reasumując Doktorant wykazał, iż toksyczność Nanocząstek srebra jest silnie powiązana ze statusem redoks komórek będącym konsekwencją aktywności łańcucha oddechowego. Pozwoliło to Doktorantowi na postawienie hipotezy większej wrażliwości na nanocząstki srebra komórek, których metabolizm silnie zależy od glikolizy. Przykładem takich komórek są neurony. Doktorant obserwował największe zmiany w transkryptomie dla genów z grupy ABC, szczególnie genu ABCA1. Zaproponował mechanizm, w myśl którego internalizacja bogatych w cholesterol fragmentów błony komórkowej, towarzysząca endocytozie nanocząstek srebra w istotny sposób zwiększa pulę cholesterolu w komórce, dostępną dla RFT. Powstałe oksysterole pełnią funkcję aktywatora czynnika transkrypcyjnego LXR. Doktorant stwierdził iż komórki intensywnie proliferujące, po zadziałaniu nanocząstek srebra wykazują profil ekspresji mRNA dla białek ABC podobny jak u różnicujących się neuronów dopaminergicznych. Doktorant w podsumowaniu formułuje 6 wniosków końcowych

- a) Dostępność glukozy moduluje toksyczność nanocząstek srebra
- b) Podatność na toksyczny efekt nanocząstek zależy od typu komórek, w szczególności ich zależności od glikolizy
- c) Nanocząstki srebra nie wywołują stresu azotowego
- d) Prekursorowe komórki neuronalne wykazują większą podatność na zmianę ekspresji genów białek ABC wywołanych nanocząstkami srebra niż zróżnicowane neurony dopaminergiczne.
- e) Aktywność biologiczna nanocząstek srebra przypomina proces różnicowania neuronów na poziomie zmiany ekspresji genów ABC
- f) Nanocząstki srebra aktywując czynnik transkrypcyjny LXR powodują zwiększoną ekspresję genu ABCA1 z możliwymi konsekwencjami zaburzeń w homeostazie cholesterolu.

Trudno się z tymi wnioskami nie zgodzić. Recenzent jest pod dużym wrażeniem jakości wyników uzyskanych w 3-ciej publikacji z cyklu prac.

Recenzentowi przysługuje prawo, a nawet obowiązek krytycznej oceny osiągnięcia Doktoranta oraz zwrócenia uwagi na pojawiające się błędy edytorskie, merytoryczne i językowe.

Na stronie 5-tej wstępu Doktorant komentując zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia rekapituje „co skutkuje rozpadem mitochondriów”. Nasuwa się pytanie „co poeta miał na myśli”. Na tej samej stronie Doktorant opisuje nadtlenoazotyn jako czynnik nitrujący. W światowym piśmiennictwie nie ustaje dyskusja odnośnie chemicznej natury czynnika nitrującego w kontekście dwutlenku azotu powstającego z nadtlenoazotynu, recenzenta ciekawi opinia Doktoranta na ten temat. Na stronie 6-tej w celach pracy w punkcie 2-gim Doktorant autorytatywnie formułuje cel jako „Rozstrzygnięcie roli stresu azotowego w toksyczności nanocząstek srebra”. Rolą badacza jest analiza, a nie rozstrzyganie w skromnej opinii recenzenta. Na stronie 9-tej Doktorant używa określenia „aktywność łańcucha mitochondrialnego” – o jakim łańcuchu wspomina, czyżby oddechowym?

Wnikliwa analiza tych niedociągnięć prowadzi do konkluzji, że całość rozprawy czyta się z przyjemnością i Doktorant nie przysporzył zbyt wiele przykrych pracy recenzentowi. Znalezione nieliczne niedociągnięcia w żadnej mierze nie umniejszają znaczącej wartości naukowej ocenianej rozprawy. Jak już wspomniano poprzednio silną stroną ocenianej rozprawy jest wysoki współczynnik IF prac. W podsumowaniu recenzent stwierdza z pełnym przekonaniem:

- a) Praca dotyczy ważnego problemu medycznego o implikacjach praktycznych
- b) Rozprawa jest metodologicznie i praktycznie poprawna
- c) Poszczególne prace badawcze z cyklu zostały prawidłowo zaprojektowane i przeprowadzone w myśl obowiązujących standardów naukowych
- d) Analiza otrzymanych wyników została przeprowadzona prawidłowo, a wnioski z ich wypływające zostały właściwie sformułowane. .
- e) Dyskusja prowadzona przez Doktoranta świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu. Doktorant nie tylko solidnie omówił swoje wyniki ale porównał je z obserwacjami innych autorów.

Rozprawa stanowi oryginalne osiągnięcie badawcze, które wynika z serii powiązanych ze sobą publikacji autora i potwierdza dojrzałość naukową Doktoranta. Oceniając pozytywnie pod względem formalnym jak i merytorycznym rozprawę doktorską Mgr Mariusza Żuberka wnoszę do wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Mgr Mariusza Żuberka do dalszych etapów przewodu doktorskiego zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Ze względu na bardzo wysoką merytoryczną wartość rozprawy zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem:

Gdańsk, 27.05.2018

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
Katedra i Zakład Chemii Medycznej  
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1  
tel. (+48 58) 349 14 50  
fax (+48 58) 349 14 56

*Prof. dr hab. med.*  
*Michał Woźniak*

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej  
  
*prof. dr hab. med. Michał Woźniak*