



Dr hab. Teresa Kral

Wrocław, 17.06.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Lichoty zatytułowanej:
Właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanocząstek fulerenolu C₆₀(OH)₃₆.**

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biofizyki Molekularnej Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr. hab. Anity Krokosz, prof. UŁ. Przedstawiona do oceny rozprawa składa się z trzech prac już opublikowanych oraz jednej pracy przesłanej do redakcji:

1. **Lichota A.**, Szabelski M., Krokosz A.: *Quenching of protein fluorescence by fullereneol C₆₀(OH)₃₆ nanoparticles: time-resolved fluorescence studies* 2022. Manuskrypt publikacji wysłany do redakcji Molecules.
2. **Lichota A.**, Piwońoski I., Michlewska S., Krokosz A.: *A multiparametric study of internalization of fullereneol C₆₀(OH)₃₆ nanoparticles into peripheral blood mononuclear cells: cytotoxicity in oxidative stress induced by ionizing radiation*, International Journal of Molecular Sciences, 21(7):2281, 2020.
3. **Lichota A.**, Krokosz A.: *Fulerenole w terapii i diagnostyce chorób nowotworowych*, Medycyna Pracy, 67(6):817-831, 2016.
4. Krokosz A., **Lichota A.**, Nowak K., Grębowski J.: *Carbon nanoparticles as possible radioprotectors in biological systems*, Radiation Physics and Chemistry, 128, 143–150, 2016.

Prace nr 2 i nr 4 to oryginalne prace badawcze w języku angielskim, które ukazały się w 2016 oraz 2020 roku. Praca nr 1 to praca w języku angielskim i jest przesłana do redakcji w roku 2022. Praca nr 3 jest jedyną pracą w języku polskim. Prace opublikowane w języku angielskim to prace w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z Impact Factor (IF) wynoszącymi 4.412, 5,924, 2,858, co odpowiadało 140, 140 oraz 70 punktom MNiSW w latach publikacji. Praca w języku polskim jest pracą przeglądową (ze streszczeniem w języku angielskim) z IF wynoszącym 0,914 co odpowiada 40 punktom MNiSW z roku jej publikacji (2016). Wszystkie cztery prace mają charakter współautorski a udział Pani mgr Anny Lichoty, zgodnie z załączonymi oświadczeniami współautorów, jest wyraźnie określony na 50, 50, 70 oraz 35% i obejmuje wszystkie etapy pracy naukowej, poczynając od udziału Doktorantki w tworzeniu koncepcji prezentowanych prac, zaplanowaniu badań poprzez przeprowadzenie większości eksperymentów, analizę statystyczną,



wykonanie zdjęć konfokalnych, pomiary z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych, analizę danych, aż po współudział w przygotowaniu strony graficznej uzyskanych wyników oraz manuskryptów prac stanowiących osiągnięcie. Sumaryczny IF dla prac opublikowanych a wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 9,696, plus IF pracy wysłanej do redakcji Molecules 4,412.

Do cyklu publikacji włączono dodatkowo 30 stron opracowania autorskiego Pani mgr Anny Lichoty w języku polskim. Opracowanie obejmuje następujące rozdziały: wprowadzenie wraz z jasno określonym celem pracy i hipotezą badawczą, materiały i metodykę badań, omówienie wyników, szczegółowe ich podsumowanie i wnioski. Całość kończy rzeczowo i zwięźle zredagowane streszczenie całości uzyskanych wyników w języku polskim i angielskim. W opracowaniu autorskim rozprawy doktorskiej zamieszczona jest również lista pozostałych sześciu prac z dorobku Doktorantki. To prace opublikowane w czasopismach z listy JCR, których Pani mgr Anna Lichota jest współautorem, podobnie jak 11 komunikatów konferencyjnych o zasięgu międzynarodowym i 17 komunikatów o zasięgu krajowym. Sumaryczny IF dla dorobku Doktorantki niewchodzącego w skład rozprawy doktorskiej wynosi 28,944.

W ramach działalności naukowej, w latach 2016-2018 Doktorantka uzyskała dotację celową dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich a w roku 2013 brała udział jako wykonawca w projekcie dotyczącym badań mechanizmów molekularnych na styku organizm ludzki patogen – czynniki środowiska. W latach 2013 -2018 Pani mgr Anna Lichota odbyła trzy krajowe, staże naukowe (dwa miesięczne i jeden tygodniowy). W roku 2019 i 2021 działalność naukowa Doktorantki została uhonorowana dwiema nagrodami III^o stopnia za cykl publikacji a w latach 2016-2017, nagrodzone zostały prezentowane przez nią postery. Przedstawione osiągnięcia naukowe Pani mgr Anny Lichoty świadczą o ciągłym i wszechstronnym pogłębianiu doświadczenia naukowego.

Doktorantka może też poszczycić się osiągnięciami w dziedzinie działalności popularyzacyjno-naukowej. Pani Mgr Anna Lichota jest członkiem dwu towarzystw naukowych, w sumie brała udział w sześciu kursach i szkoleniach dotyczących najnowszych technik pomiarowych, w tym Zetasizera, reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), Western Blotting, izolacji DNA oraz testów komórkowych do minitorowania w czasie rzeczywistym. Stanowi to



dotatkowy aspekt gromadzenia doświadczeń, które są ważne w poszerzaniu warsztatu badawczego i metodologicznego Doktorantki. Pani Mgr Anna Lichota brała udział w wielu komitetach organizacyjnych konferencji naukowych dedykowanych studentom i doktorantom oraz uczestniczyła w warsztatach i zajęciach interaktywnych popularyzujących naukę. Doktorantka pełni też wiele funkcji w ramach reprezentacji doktorantów na Uniwersytecie Łódzkim w ramach działalności społeczno-organizacyjnej.

Prowadząc swoje badania naukowe, Pani Mgr Anna Lichota podjęła problematykę bardzo istotną z punktu widzenia nanomedycyny, a mianowicie przeprowadzenie badań dotyczących mechanizmów oddziaływania nanocząstek z białkami. Nanomedycyna odnosi się do wykorzystania materiałów w nanoskali, do diagnozowania i leczenia chorób. Niektórzy badacze definiują nanomedycynę jako obejmującą wszelkie produkty medyczne wykorzystujące nanomateriały mniejsze niż 1000 nanometrów. Inni używają tego terminu w węższy sposób w odniesieniu do leków, podawanych na drodze iniekcji, zawierających nanocząstki mniejsze niż 200 nanometrów. Cokolwiek większego może nie być bezpieczne do podania do krwiobiegu. System dostarczania leków oparty na nanomedycynie ma ogromny wpływ na obszar terapii celowanej. Dzięki temu sektorowi nanotechnologii leki terapeutyczne można przyłączać do różnych bionanonośników, dzięki czemu ich zachowanie farmakologiczne zostaje ulepszone i prowadzi do wysokiej skuteczności leczenia. Obecnie najbardziej atrakcyjnymi materiałami w tej dziedzinie są nanomateriały węglowe, w tym fulereny. Fulereny można modyfikować w nieskończoność i są szeroko stosowane w terapii fotodynamicznej, terapii genowej oraz dostarczaniu leków. Oddziaływanie białko-fuleren jest jednym z pierwszych problemów jaki napotyka nanomedycyna układów biologicznych. Oddziaływanie białko-fuleren determinuje bioefektywność i toksyczność fulerenów, na co zwraca uwagę Doktorantka definiując cel swojej pracy, którym było poznanie i zrozumienie biologicznych skutków modyfikacji fulerenu do postaci hydroksylowej pochodnej jakim jest fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$.

Przechodząc do meritum, rozprawa doktorska Pani mgr Anny Lichoty dotyczy oceny skuteczności wnikania rozpuszczalnych w roztworach wodnych nanocząstek fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$, ich akumulowania się we wnętrzu komórek bez wpływu na ich przeżywalność oraz wykazywania powinowactwa i oddziaływania z różniącymi się strukturalnie białkami.



Główną częścią, przedstawionej rozprawy doktorskiej, jest zbiór czterech, spójnych tematycznie, współautorskich artykułów naukowych. Trzy z załączonych prac podlegały już procesowi recenzowania naukowego. Prezentowane prace opisują kolejne etapy pracy naukowej wykonanej przez Doktorantkę, a mianowicie:

1. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$. Wyniki tych badań wskazują, że nanocząstki fulerenolu tworzą nieagregujące, stabilne układy polidispersyjne o średnicy maksymalnej średnicy cząstek ok 190nm. Zatem stabilny fulerenol $C_{60}(OH)_{36}$ spełnia kryterium granicy rozmiarów nanocząstki mniej niż 200 nanometrów. W tym punkcie należy podkreślić, że Doktorantka deklaruje samodzielność wykonanych badań w celu charakterystyki badanego fulerenolu, co świadczy o dojrzałości i samodzielności naukowej.
2. Ocena oddziaływania fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ z albuminą osocza krwi człowieka (HSA) i dehydrogenazą alkoholową pochodzącą z *Saccharomyces cerevisiae* (ADH). Wyniki tych badań potwierdziły selektywność badanego fulerenolu, który wiąże się zarówno z białkiem HSA jak i ADH oraz wykazuje wyższe powinowactwo do białka HSA.
3. Ocena toksyczności fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka (PBMCs). Wyniki tych badań wskazują, że fulerenol akumuluje się na powierzchni, jak i we wnętrzu prawidłowych komórek krwi obwodowej człowieka bez wpływu na ich przeżywalność.
4. Nie wykazano radioprotekcyjnych właściwości fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ w warunkach prezentowanych w badaniach.

Uważam za godne podkreślenia dwa aspekty prowadzonych badań: ich konsekwencję i przejrzystość, dzięki czemu udało się uzyskać potwierdzenie hipotezy badawczej, że nanocząstki fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ wnikają do wnętrza komórek oraz wiążą się z białkami, wykazując wysokie powinowactwo do albuminy osocza człowieka (HSA).

Wyniki przeprowadzonych badań nie tylko wnoszą nowe informacje na temat działania samego fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$ w obecności białek oraz komórek krwi ale też są przyczynkiem dla zastosowania wysoce hydroksylowanych fulerenoli w zastosowaniach biomedycznych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wartościowe ze względu na ich aspekt poznawczy i mają ponadto znaczenie aplikacyjne, mogą być wykorzystane w projektowaniu dalszych fulerenoli.



Mam kilka uwag i wątpliwości, na które natknęłam się w opracowaniu autorskim Doktorantki:

1) Zarówno w punkcie 4.4., jak i punkcie 6. jest stwierdzenie, cytując: „...Pracę doktorską rozpoczęto od syntezy polihydroksylowanego fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$...”. Stwierdzenia tego nie potwierdzają jednak szczegóły oświadczeń zarówno współautorów jak i Doktorantki. Cele szczegółowe pracy już nie wspominają o procesie syntezy fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$, zatem sam proces syntezy nie był przedmiotem pracy, więc też nie może być jej początkiem.

2) Opracowanie jest napisane w sposób bardzo zwięzły i rzeczowy. Czyta się je bardzo dobrze. Nie mam uwag do strony edytorskiej.

3) Lekki niedosyt powoduje brak w opracowaniu autoorskim szerszej dyskusji i odpowiedzi na pytanie, które sugeruje zdanie znajdujące się w punkcie 4.1., czytując: „...Obecnie istnieje zbyt mało informacji na temat mechanizmów oddziaływania fulerenoli z białkami...”

Pytanie moje jest, czy na podstawie wyników uzyskanych przez Doktorantkę, możliwe jest zaproponowanie modelu takiego oddziaływania?

4) Kolejne pytania, nasunęły mi się analizując zdjęcia konfokalne prezentowane w pracy nr.2. *Lichota A., Piwońoski I., Michlewska S., Krokosz A.: A multiparametric study of internalization of fullereneol $C_{60}(OH)_{36}$ nanoparticles into peripheral blood mononuclear cells: cytotoxicity in oxidative stress induced by ionizing radiation, International Journal of Molecular Sciences, 21(7):2281, 2020.*

Pytanie 1: Czy na przyszłość nie właściwszym byłoby zastosowanie laserów wzbudzenia 380nm lub nawet 350nm zamiast 405nm? Laser o długości wzbudzenia 405nm skutkuje niskim poziomem sygnału autofluorescencji fulerenolu.

Pytanie 2: Czy w pomiarach konfokalnych na komórkach mierzona była moc lasera na obiektywie mikroskopu? Zbyt duża dawka światła wzbudzenia lasera destrukcyjnie wpływa na obiekt badania.



Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr Anny Lichoty pt. Właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanocząstek fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$. stanowi znaczący wkład w opis oddziaływań układu fulerenol-białko i fulerenol-jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka (PBMCs). Praca wskazuje na szeroką wiedzę Doktorantki w zakresie medycyny, biologii i biochemii oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej, począwszy od etapu planowania, poprzez wykonanie zadań badawczych, aż do opracowania i interpretacji wyników. Rozprawa składa się z czterech publikacji, z których trzy ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, jest spójna pod względem merytorycznym i redakcyjnym. Zaprezentowane wyniki mogą być podstawą do dalszych dyskusji i badań na temat działania samego fulerenolu $C_{60}(OH)_{36}$, ale też wysoce hydroksylowanych fulerenoli stosowanych w biomedycynie.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami).

Zwracam się zatem uprzejmie do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Anny Lichoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 17.06.2022

Dr hab. Teresa Kral