



Dr hab. Szymon Sękowski
Laboratorium Biofizyki Molekularnej
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
e-mail: s.sekowski@uwb.edu.pl

17.08.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Malinowskiej zatytułowanej
„Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”

Promotor rozprawy: Prof. dr hab. Bożena Bukowska

Promotor pomocniczy: Dr Paulina Sicińska

Recenzowana rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej. Niniejsza recenzja została sporządzona w oparciu o decyzję Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Biologiczne z dnia 27 czerwca 2023 roku, w wyniku której zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Malinowskiej.

Współczesny rozwój cywilizacyjny, zarówno w skali lokalnej jak i globalnej, sprzyja powstawaniu wielu innowacyjnych rozwiązań m.in. w farmacji, medycynie, inżynierii czy przemyśle. Z jednej strony są one szansą na opracowanie nowych technik mogących znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach nauki np. biotechnologii, bioinżynierii, genetyce molekularnej czy nanotechnologii. Z drugiej strony silny rozwój przemysłowy nie jest obojętny dla środowiska naturalnego. Przykładem mogą być zmiany klimatyczne i będące ich następstwem różnego rodzaju klęski ekologiczne np. susze czy gwałtowne zjawiska meteorologiczne. Zagrożeń jest oczywiście więcej a jednym z nich jest mikroplastik. Zagadnienie związane z obecnością mikrocząstek i nanocząstek plastiku w środowisku jest obecnie coraz szerzej badane. Jednocześnie wskazuje się, że mikroplastik stanowi globalny czynnik zanieczyszczenia środowiska podobnie jak np. dwutlenek węgla. Skażenie mikroplastikiem może w istotny sposób zaburzać funkcjonowanie np. ekosystemów wodnych czy lądowych, a wchłanianie i odkładanie się mikroplastiku w organizmach żywych prowadzi do jego ekspansji w łańcuchu troficznym skutkując rozprzestrzenianiem się skażenia również na organizm człowieka. Intoksykacja mikroplastikiem i nanoplastikiem może zachodzić nie tylko



drogą pokarmową, ale również oddechową i dermalną skutkując rozwojem różnego rodzaju stanów patologicznych. Z tego względu niezwykle ważne są badania związane z określeniem zagrożeń jakie niesie mikro- i nanoplastik dla środowiska oraz poznaniem i wyjaśnieniem mechanizmów toksycznego wpływu mikrocząstek i nanocząstek plastiku na układy biologiczne również na poziomie komórkowym.

Analiza rozprawy doktorskiej

Tematem rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Malinowskiej jest „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”. Zagadnienie poruszone przez Autorkę jest niezwykle interesujące, bardzo ważne zarówno z biologicznego jak i toksykologicznego punktu widzenia oraz wpisuje się w nurt badań związanych z zagrożeniami związanymi ze skażeniem środowiska mikro i nanoplastikiem.

Recenzowana rozprawa doktorska jest opracowaniem pisemnym i stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych z dołączonym streszczeniem w języku polskim i w języku angielskim. Pod względem formalnym praca doktorska Pani mgr Kingi Malinowskiej spełnia wymogi artykułu 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 (Dz. U. 2018 poz. 1668).

Na początku prezentowanej rozprawy doktorskiej został umieszczony spis treści, spis publikacji wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej oraz streszczenia (w j. polskim i j. angielskim). Następnie Doktorantka zamieściła część przedstawiającą „Cel naukowy i omówienie wyników”. W tym fragmencie zostało ujęte krótkie wprowadzenie do badanego zagadnienia, które w sposób wyczerpujący uzasadnia dlaczego zostały podjęte przeprowadzone przez Panią mgr Kingę Malinowską badania. Następnie Autorka formułuje cel pracy oraz przedstawia materiał badawczy i stosowane metody. Kolejny fragment zamieszczony na stronach 14-19 opisuje otrzymane wyniki. W dalszej części Doktorantka przedstawiła podsumowanie oraz wnioski. Całość kończy wykaz zastosowanej literatury uzupełniającej, w której ponad 70% stanowią prace z ostatnich 8 lat.

Kolejna część rozprawy przedstawia dorobek naukowy Autorki. Zasadniczą część dysertacji stanowią 4 publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej tj.

1. „*Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms*” (IF=8,041, pkt. MEiN=100)
2. „*Oxidative Properties of Polystyrene Nanoparticles with Different Diameters in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (In Vitro Study)*” ((IF=6,208, pkt. MEiN=140)
3. „*Polystyrene nanoparticles: the mechanism of their genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells*” (IF=5,881, pkt. MEiN=140)
4. „*The effect of nonfunctionalized polystyrene nanoparticles of different diameters on the induction of apoptosis and mTOR level in human peripheral blood mononuclear cells*” (IF=8,943, pkt. MEiN=140)

które zostały ułożone w sposób przemyślany tworząc zwartą i logiczną pod względem układu treści całość. Sumaryczny IF publikacji (1-4) wchodzących w skład recenzowanej rozprawy



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738 8383 • e-mail: biologia.dziedkanat@uwb.edu.pl • biologia.uwb.edu.pl



doktorskiej wynosi $\Sigma_{IF}=29,073$, natomiast punktów ministerialnych $\Sigma_{MEIN}=520$. Ponadto we wszystkich pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Kinga Malinowska jest pierwszym Autorem z co najmniej 55% udziałem w powstaniu każdej z prac.

Pierwsza z publikacji (1), stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej, jest opracowaniem przeglądowym zawierającym opis aktualnej literatury dotyczącej mikro- i nanocząstek plastiku. Pod tym względem może być ona traktowana jako główny wstęp teoretyczny dysertacji. Autorka opisuje źródła mikroplastiku i nanoplastiku, mechanizmy ich akumulacji w organizmie i penetracji do komórek oraz toksyczność polistyrenu zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

W drugiej pracy (2), stanowiącej pierwszą przedstawiającą otrzymane w efekcie badań eksperymentalnych wyniki, Autorka potwierdza metodą DLS rozmiar stosowanych nanocząstek polistyrenowych (odpowiednio 29 nm, 44 nm i 72 nm) oraz bada ich wpływ na generowanie reaktywnych form tlenu (RFT), peroksydację lipidów i białek oraz apoptozę i przeżywalność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka wykazując, że wszystkie stosowane NPs podwyższają poziom RFT, indukują peroksydację lipidów i protein oraz apoptozę, jednocześnie obniżając przeżywalność komórek. Stwierdzono również, że największą cytotoksyczność spośród badanych NPs posiadają najmniejsze, 29 nm nanocząstki polistyrenu.

Trzecia publikacja (3) wchodząca w skład rozprawy doktorskiej została opublikowana w czasopiśmie *Nanotoxicology* i dotyczy badania mechanizmu genotoksyczności polistyrenowych NPs względem jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka. Doktorantka wykazała, że 24-godzinna inkubacja komórek z badanymi NPs skutkowałą pojedynczymi i podwójnymi pęknięciami DNA oraz prowadziła do oksydacyjnego uszkodzenia pirymidyn i puryn (tych ostatnich w większym stopniu). Efekt był zależny zarówno do stężenia jak i średnicy badanych NPs. Ponownie okazało się, że najmniejsze spośród badanych nanocząstek polistyrenu posiadały największą cytotoksyczność i genotoksyczność przejawiającą się w indukowaniu, w stężeniu 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, powstawania 8-hydrokso-2-deoksyguanozyny. Jednocześnie, uszkodzenia DNA spowodowane przez 29 nm NPs, w przeciwieństwie do 44 nm i 72 nm NPs, nie były naprawiane w pełni w czasie 2 godzin.

Ostatni, czwarty manuskrypt (4) wchodzący w skład rozprawy doktorskiej Pani Mgr Kingi Malinowskiej jest związany z określeniem proapoptotycznych mechanizmów aktywności badanych NPs polistyrenu i został opublikowany w czasopiśmie *Chemosphere*. Autorka wykazała, że wszystkie stosowane nanocząstki, w sposób zależny od stężenia, prowadziły do wzrostu zarówno odsetka komórek apoptotycznych jak i cytozolowego stężenia jonów wapnia, podwyższały aktywność kaspazy 3 i kaspazy 9 oraz poziom Ser/Thr kinazy mTOR oraz obniżały potencjał mitochondrialny. W przypadku aktywności kaspazy 8 zmiany były istotne statystycznie tylko dla NPs o średnicy 29 nm dla 3 najwyższych stężeń tj. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, co wskazuje na możliwość aktywacji przez te NPs zewnętrznego szlaku apoptozy.

Jestem pod ogromnym wrażeniem zastosowanej przez Panią Mgr Kingę Malinowską metodologii i mnogości technik badawczych zarówno tych stricte fizykochemicznych tj. analiza potencjału zeta, mikroskopia sił atomowych (AFM), skaningowa mikroskopia elektronowa



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738 8383 • e-mail: biologia.dzianat@uwb.edu.pl • biologia.uwb.edu.pl



(SEM), analiza dynamicznego rozpraszania światła (DLS) jak i biologicznych tj. test MTT, ocena poziomu RFT, peroksydacja lipidów i białek, analiza pęknięć DNA, uszkodzeń oksydacyjnych i naprawy DNA, aktywność kaspaz, poziom kinazy mTOR, analiza apoptozy i autofagii, znakowanie fluorescencyjne, potencjał mitochondrialny, eksternalizacja fosfatydyloseryny czy poziom jonów wapnia.

Wszystkie zastosowane w pracy metody badawcze zostały dobrane w sposób prawidłowy i są w pełni uzasadnione. Umożliwiło to Autorce zbadanie w sposób niezwykle dokładny i jednocześnie w szerokim aspekcie wpływu nanocząstek polistyrenowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Dzięki temu Pani mgr Kinga Malinowska w pełni zrealizowała zamierzony przez siebie cel pracy.

Pomimo bardzo dobrze przygotowanej rozprawy Autorka nie uniknęła pewnych nieścisłości np. brak jednostki gęstości komórek na stronie 12 (czy była to ilość komórek na „ml”, „dm³” czy inną objętość) czy zaznaczenie, że wyniki zostały zawarte w manuskrypcie gotowym do wysłania (podczas gdy został on finalnie opublikowany) oraz literówek np. zamiast skrótu „ μm ” pojawiają się „mm”. Są to generalnie drobne błędy i w żaden sposób nie wpływają na bardzo dużą wartość naukową i merytoryczną pracy.

Jednocześnie mam kilka małych pytań, które pojawiły się w trakcie recenzowania rozprawy. Odnosząc się do pracy, w której Autorka analizowała peroksydację białek i jako marker wskazujący na utlenianie monitorowała spadek fluorescencji tryptofanu chciałbym zapytać czy były brane pod uwagę również analizy poziomu formylokinureniny i kinureniny świadczące o oksydacji tryptofanu, oznaczenie grup tiolowych czy sulfotlenków metioniny i czy rozważano, czy na spadek fluorescencji Trp w obecności badanych nanocząstek nie wpływało po prostu oddziaływanie NPs z białkami i zwykłe gaszenie fluorescencji na drodze kompleksacji NPs z proteinami, co opisuje wiele prac związanych z analizą oddziaływania pomiędzy różnymi typami nanocząstek a białkami. Jednocześnie chciałbym poprosić o wyjaśnienie, co było podstawą zróżnicowania RFT na reaktywne formy tlenu i wysoce reaktywne formy tlenu, czy był to np. okres półtrwania czy jakiś inny czynnik różnicujący i jak były wyznaczane wartości LC₅₀ czy IC₅₀ tzn. czy było stosowane jakieś dopasowanie np. funkcja liniowa? Określenie, że LC₅₀ jest powyżej 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (wykres 5 w publikacji nr 2) czy IC₅₀ > 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ w publikacji nr 3 wydaje się być trochę mało precyzyjne. Na koniec chciałbym zapytać jaki marker był dodawany w stężeniu 2 μM (publikacja w *Int.J.Mol.Sci* 2021, *Materiały i Metody, podrozdział 4.7 (Lipid Peroxidation)* i 4.8 (*Protein Oxidation*)) i czy Doktorantka ma jakiś pomysł jak można wyjaśnić, że badane nanocząstki polistyrenu powodowały wzrost poziomu kinazy mTOR w stężeniach niższych niż te, które indukowały apoptozę, natomiast dla stężeń wyższych (indukujących apoptozę) odnotowano zmniejszenie poziomu mTOR?

Podsumowanie recenzji

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Kingi Malinowskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu jakim jest zbadanie wpływu nanocząstek polistyrenowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka i wnosi zupełnie nową wiedzę dotyczącą



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738 8383 • e-mail: biologia.dzieskanat@uwb.edu.pl • biologia.uwb.edu.pl



cytotoksycznej aktywności tych nanocząstek. Praca została przygotowana w sposób rzetelny, jest spójna, a kolejne badania w sposób logiczny wynikają z poprzednich. Jako całość recenzowana rozprawa doktorska stanowi doskonałe kompendium merytoryczno-metodologiczne związane z oddziaływaniem i wpływem nanocząstek polistyrenowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka.

Recenzowana dysertacja w pełni dowodzi, że Pani mgr Kinga Malinowska posiada szeroki zakres wiedzy dotyczącej zarówno opisywanego zagadnienia jak i metod fizykochemicznych i technik biologii molekularnej, co w pełni potwierdza umiejętność doktorantki do samodzielnego planowania i prowadzenia pracy naukowej.

Bardzo mocno należy podkreślić, że Autorka dysponuje wspaniałym dorobkiem naukowym. Łącznie jest współautorką pięciu prac z listy JCR o całkowitym IF wynoszącym 33,629 i sumie punktów MEiN 680, dwóch rozdziałów w monografiach oraz pozyskała dwuletni grant NCN w ramach programu „Preludium” pt. „Nanocząstki polistyrenowe i ich właściwości epigenetyczne i genotoksyczne w ludzkich jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej”. Ponadto aktywnie uczestniczy w upowszechnianiu wyników prowadzonych prac eksperymentalnych mając na koncie 8 doniesień konferencyjnych oraz brała udział w popularyzowaniu nauki wygłaszając prelekcje i organizując warsztaty np. w ramach Festiwalu Nauki, Techniki i Sztuki czy Nocy Biologów.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Malinowskiej pt. „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka” spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom na stopień naukowy „doktora” określone w ustawie - Ustawa Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z tym wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie Nauki Biologiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania doktorskiego i o nadanie Pani mgr Kingi Malinowskiej stopnia naukowego „doktora”.

Wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska prezentuje szczególne walory poznawcze wnosząc zupełnie nową wiedzę na temat wpływu nanocząstek polistyrenowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka oraz prezentuje imponujący zakres badań. Ponadto efektem zrealizowanych prac eksperymentalnych są 3 publikacje z listy JCR o wysokim IF, wszystkie opublikowane w czasopiśmie posiadających 140 punktów wg. MEiN. Z tego względu składam do Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Biologiczne wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Malinowskiej.

Dr hab. Szymon Sękowski

Sękowski Szymon

