



Uniwersytet  
Jana Kochanowskiego  
w Kielcach

Kielce, dnia 5 września 2023 r.

Dr hab. Karol Ciepluch, Prof. UJK  
Zakład Biologii Medycznej, Instytut Biologii,  
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych,  
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

### **Ocena pracy doktorskiej mgr Kingi Malinowskiej**

**pt: „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”**

Przedstawiona mi do recenzji praca Pani Kingi Malinowskiej dotyczy bardzo ważnego i ciekawego zagadnienia na temat toksyczności nanoplastiku (nanocząstek polistyrenu). Mimo obecności plastiku w środowisku już od wielu dziesięcioleci, zaskakującym jest fakt iż badania dotyczące toksyczności mikroplastiku a w szczególności nanoplastiku nabrały rozpędu dopiero w ostatnim dziesięcioleciu. W naukowych bazach danych łatwo znaleźć informacji, że gwałtowny wzrost prac o tematyce nanoplastiku i jego toksycznego wpływu na tkanki i komórki człowieka zauważalny jest dopiero od 2018-2019 roku, czyli mniej więcej w czasie rozpoczęcia prac badawczych doktorantki. Świadczy to o idealnym momencie wpisania się w światowy trend naukowy dotyczący niesamowicie ważnego zagadnienia. Praca badawcza dotyczy przede wszystkim wpływu nanoplastiku na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC). Nie dziwi więc fakt, iż doktorantka wzięła pod lupę wpływ nanoplastiku (<100 nm), który może się tworzyć z mikroplastiku (<500 nm). Tak małe rozmiary powodują, że nanoplastik jako pochodna stosowanego plastiku w wielu gałęziach przemysłu w tym farmaceutycznego, laboratoryjnego czy też kosmetycznego, łatwo może przechodzić przez bariery biologiczne, kumulować się w tkankach i wyrządzając poważne szkody w organizmie.

W skład pracy doktorskiej wchodzi 4 artykuły, w tym 1 przeglądowy, a więc rozprawa doktorska ma formę tzw. cyklu publikacji. Praca doktorska obejmuje spis publikacji

wchodzących w zakres rozprawy, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, cel naukowy oraz omówienie wyników, dorobek naukowy, kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów prac. W celu naukowym i opisie wyników dodatkowo doktorantka uwzględniła 49 pozycji literaturowych. We wprowadzeniu doktorantka opisuje ogólny wpływ nanoplastiku na organizmy żywe, obecność nanoplastiku w organizmie człowieka oraz jego toksyczność. We wprowadzeniu występuje jednak zdanie mogące nieco wprowadzać w błąd, bowiem autorka sugeruje iż nie ma jak dotąd badań dotyczących działania nanoplastiku na ludzki układ krwionośny. Oczywiście nie jest to prawda, bo takie badania są, jednakże zakładając iż prace badawcze doktorantka zaczęła w czasie pojawiania się pierwszych takich prac można ten błąd wybaczyć, choć bez wątplenia wprowadzenie powinno być lepiej zaktualizowane. Cel pracy został postawiony prawidłowo. Dobór materiału badawczego i metod badawczych jest odpowiedni, choć nie ma informacji dlaczego akurat cząstki nanoplastiku o rozmiarach 29, 44 oraz 72 nm zostały wybrane do badań. Pomimo, iż nie mam zastrzeżeń do wyboru metod, mam kilka zastrzeżeń do sposobu analizy i wyciągnięcia prawidłowych wniosków które pojawiły się w artykułach a więc tym samym w podsumowaniu. Według mnie jest tam kilka błędów o których wspomnę analizując konkretne prace wchodzące w cykl publikacji. Po opisie metod badawczych doktorantka przedstawia omówienie wyników badań. Postanowiłem jednak przeanalizować poszczególne publikacje a następnie odnieść się do podsumowania wyników przedstawionych przez doktorantkę, tym bardziej, że doktorantka trochę się gubi w opisie wyników, raz analizując wyniki z pracy trzeciej a następnie z pracy drugiej.

Pierwsza praca przeglądowa pt., *Polystyrene nanoparticles; sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms*”, została opublikowana w *Environmental Pollution* o IF- 8,041. Praca w dostateczny sposób prezentuje zarówno źródła nanoplastiku w środowisku jak i jego wpływu na organizmy żywe. Praca została napisana w bardzo przejrzysty i dokładny sposób, zatem nie dziwi fakt, że została opublikowana w czasopiśmie o dość wysokim IF. Nie mam również wątpliwości, iż rozpoczęcie pracy doktorskiej od napisania tzw. przeglądownki jest niezłym pomysłem, ponieważ pozwala młodemu człowiekowi wdrożyć się w badaną tematykę. Kolejny artykuł to pierwsza praca oryginalna pt., *Oxidative properties of polystyrene nanoparticles with different diameters in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*” opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Science*, IF- 6,208. Praca dotyczy właściwości prooksydacyjnych stosowanych nanocząstek. Według autorów publikacji nanocząstki plastiku indukują reaktywne formy tlenu (ROS) co jest ściśle powiązane z żywotnością komórek

PBMC. Zauważają, że już najmniejsze stężenie tj. 0.01 µg/mL cząstek o rozmiarze 29 nm może być już szkodliwe, a tak niskie stężenie można już znaleźć we krwi. Łatwo można zauważyć, iż artykuł ten jest wstępną pracą w całym cyklu badań i na jej podstawie wybrano odpowiedni zakres stężeń nanocząstek a także wybrano odpowiednie metody uwzględnione w dalszych pracach. Pomimo recenzji i opublikowania pracy w ostatecznej i najdoskonalszej formie, można zauważyć kilka nieścisłości które rzutują również na dalsze etapy pracy badawczej. W pierwszej części prezentowane są wyniki z DLS (dynamicznego rozpraszania światła) wskazujące na rozmiary cząstek nanoplastiku. Autorzy słusznie zauważają, że jest on mniej więc taki sam jak podaje producent. To co jest trochę dziwne to fakt, że prezentowane są wyniki tzw. *number (percent)* a w kolejnych artykułach mamy już *volume (percent)*. Zatem dwa parametry tych samych cząsteczek w dwóch różnych pracach. Nie jest napisane dlaczego w ten sposób? Następnie prezentowane są wyniki peroksydacji białek z wykorzystaniem metody wygaszania fluorescencji tryptofanu. Dodatkowo wkrada się informacji, iż ta metoda mówi nam o uszkodzeniach białka. W moim przekonaniu jest to błąd, bowiem wygaszanie fluorescencji tryptofanu w białku może być spowodowane wieloma rzeczami np. zmiany konformacji białka czy też zmiany w warstwie hydratacyjnej białka a niekoniecznie jego uszkodzeniem a już na pewno nie peroksydacji. Wszystko zależy od rodzaju białka, liczbie tryptofanów, jego ekspozycji na powierzchni a także formy białka tj. czy jest monomerem czy też dimerem itp. Nie wspominając już o rodzaju oddziaływania nanocząstek z białkiem z uwzględnieniem analizy termodynamicznej. Ten błędny „fakt” powtarza się w całej rozprawie doktorskiej.

Kolejna praca opublikowana w *Nanotoxicology* o IF-5,881 pt., *Polystyrene nanoparticles; the mechanism of their genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells*” dotyczy przedstawienia mechanizmu genotoksyczności stosowanych nanocząstek. Jest to kolejny słuszny etap pracy doktorskiej gdzie od ogólnej analizy toksyczności opisanej w pierwszej pracy doktorantka przechodzi do dokładniejszej analizy mechanizmu stojącego za toksycznością nanoplastiku. Podsumowaniem tej pracy jest informacja, iż stosowane niefunkcjonalne nanocząstki plastiku indukują jedno, jak i dwuniciowe pęknięcia DNA, powodują oksydacje puryn i pirymidyn oraz powodują wzrost poziomu 8-oxodG. Najmniejsze nanocząstki tj. 29 nm powodują największe zmiany co autorzy podsumowują, iż może to być spowodowane najniższym potencjałem zeta i najmniejszym rozmiarem, co ułatwia penetrację do komórki. O ile sam fakt, iż najmniejsze nanocząstki mogą wyrządzić największą „krzywdę” jest niezaprzeczalny, to utożsamianie go z najniższym potencjałem zeta jest niewystarczające tym bardziej, iż analiza DLS i potencjału zeta jest w mojej opinii przeprowadzona niedokładnie.

Choć w bazach danych można zauważyć analizę DLS i zeta potencjału różnych nanocząstek w mediach hodowlanych jak w tym przypadku RPMI, to powinno się tego unikać jeżeli nie mamy dodatkowych danych. Autorka słusznie zauważyła, iż nanocząstki w mediach hodowlanych mogą tworzyć koronę biało-nanocząstki, co zmieni zarówno ładunek powierzchniowy jak i rozmiar nanocząstek, ale bez dodatkowych analiz nie można sugerować iż potencjał zeta nanocząstek w medium jest niższy bądź wyższy a rozmiar mniejszy bądź większy. W tym przypadku mamy do czynienia ze złożonym układem a zmiany potencjału zeta i DLS bez podania np. indeksu polidispersyjności jest mało znaczące. Takie zmiany mogą powodować np. zmniejszoną bądź zwiększoną agregację nanocząstek a wtedy nie mamy oddziaływania nanocząstek np. o rozmiarze 44 nm, a dużo większych agregatów z komórkami. Dodatkowo autorzy pracy sugerują iż ma to wpływ na łatwiejsze przechodzenie do komórek. Raczej mylące jest tu utożsamianie wartości potencjału zeta z ładunkiem nanocząstek. Chciałbym w tym miejscu wspomnieć, iż negatywnie naładowane nanocząstki nie koniecznie muszą łatwiej przechodzić przez błonę komórkową co wynika z jej ładunku.

Ostatnia praca opublikowana została w *Chemosphere* o IF-8,943 pt., *The effects of nfn-functionalized polystyrene nanoparticles of different diameters on the induction of apoptosis and mTOR level in human peripheral blood mononuclear cells*<sup>11</sup>. Tutaj doktorantka przechodzi do analizy wpływu wybranych nanocząstek na indukcję procesu apoptozy oraz poziomu białka mTOR. Na uwagę zasługuje świetny dobór metod badawczych i bardzo dokładna analiza uzyskanych wyników. W podsumowaniu można wyczytać, iż nanocząstki plastiku indukują apoptozę poprzez mitochondrialny szlak i wzrost poziomu cytozolowego jonów wapnia  $Ca^{2+}$ . Najmniejsze nanocząstki o średnicy 29 nm dodatkowo indukują wzrost aktywności kaspazy 8. Widać również wzrost poziomu kinazy mTOR. W mojej opinii jest to najlepsza praca z całego cyklu, gdzie nie mam żadnych zastrzeżeń.

Po analizie publikacji wchodzących w cykl pracy, postanowiłem opisać to co jest przed nimi czyli posumowanie wyników. Doktorantka w miarę dokładny sposób podsumowuje wyniki z opublikowanych prac, dobrze wyciągając wnioski np. to że najmniejsze czyli o rozmiarze 29 nm nanocząstki powodowały największe efekty apoptotyczne, aktywowały zewnętrzny szlak apoptozy czy też są najbardziej genotoksyczne, jednak kilka błędów zostało utrwalonych takich jak np. te dotyczące potencjału zeta i DLS w pożywce RPMI. Widać również, że podsumowanie nie było od dawna zaktualizowane bowiem jest tam np. informacja o pracy gotowej do wysłania, a w cyklu publikacji dostajemy już opublikowany artykuł.

Podsumowując, cykl publikacji wchodzących w skład prace doktorskiej Pani Kingi Malinowskiej jest świetny. Zaczyna się od pracy przeglądowej, oryginalnej o raczej ogólnej

toksyczności na komórki PBMC, poprzez analizę gonotoksyczności i na koniec apoptozy. Publikacje znajdują w bardzo dobrych czasopismach i pomimo kilku błędów, wyciągnięte wnioski są prawidłowe a cel postawiony na początku jak najbardziej osiągnięty. Nie mam wątpliwości, iż rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego oraz prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Indywidualny wkład kandydatki w każdą z prac na podstawie załączonych oświadczeń nie budzi wątpliwości.

Dodatkowo jestem również przekonany, że uzyskana w ten sposób wiedza poprzez udział doktorantki przyczyni się do dalszego rozwoju naukowego zespołu badawczego w którego skład wchodziła Pani Malinowska.

Na koniec recenzji chciałbym również wspomnieć o całkowitym zaangażowaniu doktorantki w prace naukowe. Warto wspomnieć o 8 doniesieniach zjazdowych w tym jednym zagranicznym w Maastricht we wrześniu 2022 na konferencji..... tu nie wiadomo dlaczego nie ma tytułu konferencji, choć właśnie tym najbardziej powinna się pochwalić doktorantka. Zapewne chodzi o 16th International Congress of Toxicology (ICTXVI). Prowadziła również wiele warsztatów co świadczy o wysokim zaangażowaniu doktorantki również w popularyzowaniu nauki. Należy również wspomnieć o zdobytym grancie dla doktorantów z Narodowego Centrum Nauki- Preludium.

Pomimo kilku błędów które można znaleźć w rozprawie doktorskiej, uważam, że praca jest wykonana w bardzo dobry sposób. uwzględnia zarówno dogłębną analizę światowej wiedzy na temat toksyczności nanoplastiku po dogłębną analizę mechanizmów stojąca za jego toksycznością na komórki PMBC, co potwierdza fakt publikacji w czasopismach o wysokim IF i cytowalności od 5 do 17 cytowań w pracach oryginalnych, a w przeglądowej aż 170 według bazy Scopus. Biorąc wszystkie zalety pracy wspomnianej powyżej, nie mam wątpliwości, iż praca doktorska zasługuje na **wyróżnienie**.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Mgr Kingi Malinowskiej pt. „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych nanocząstek polistyrenu w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz.1668). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w

dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.  
Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani Kingi Malinowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

*Konrad Ciepluch*