



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biologii Komórki

dr hab. MARTA MICHALIK, prof. UJ

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej

pt. „Biochemiczno-biofizyczne aspekty cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku cynku” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Barbasz, prof. UP z Katedry Biochemii i Biofizyki Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Nanotechnologia, dziedzina nauki, której początki sięgają lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, w ostatnich latach rozwija się bardzo dynamicznie. Produkty z udziałem nanomateriałów (wykorzystujących nanocząstki metali i tlenków metali) znalazły zastosowanie niemal we wszystkich dziedzinach życia: elektronice, elektrotechnice, kosmetyce, farmacji, medycynie, rolnictwie, przemyśle spożywczym oraz chemicznym, gdyż jak się powszechnie uważa, mogą wpływać na polepszenie warunków pracy i życia człowieka. Jednym z najczęściej stosowanych obecnie nanomateriałów są nanocząstki tlenku cynku (ZnO-NPs) używane ze względu na ich specyficzne właściwości fizyko-chemiczne, fotokatalityczne oraz przeciwdrobnoustrojowe. Powszechność ich stosowania i stale rosnący poziom tych substancji w środowisku (powietrzu, wodzie, glebie) wzbudza niepokój wielu naukowców i lekarzy. Wzrastające zastosowania nanoproduktów mogą nieść ze sobą nieuświadomione jeszcze zagrożenia, szczególnie, że wciąż niewiele wiadomo na temat mechanizmów interakcji nanocząstek (w tym nanocząstek tlenku cynku) z organizmami żywymi, stąd wynika pilna potrzeba badań wpływu tych związków na organizm człowieka i środowisko.

Wśród ośrodków naukowych zajmujących się od lat badaniami potencjalnych zagrożeń jakie niosą nanocząstki metali i tlenków metali jest zespół z Katedry Biochemii i Biofizyki Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UP, kierowany przez Panią prof. Annę Barbasz, promotora przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej. Zatem, oceniana praca została wykonana w zespole mającym doświadczenie w tego rodzaju badaniach i pod opieką promotora o dużych osiągnięciach naukowych w tej dziedzinie. Pod opieką Promotora Doktorantka wykonała kompleksowe analizy biochemiczne i biofizyczne wpływu komercyjnych nanocząstek tlenku cynku na wybrane komórki eukariotyczne w hodowli *in vitro* i uzyskała nowatorskie wyniki, wskazujące na cytotoksyczność badanych nanocząstek,

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48

(12) 664 61 44, FAX: +48 (12) 664 62 09
email: marta.michalik@uj.edu.pl

która istotnie zależy od rodzaju komórki i jest przede wszystkim efektem oddziaływań ZnO-NPs z lipidami błony komórkowej.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa została przygotowana w formie zwartej krótkiego opracowania, do którego został włączony zbiór opublikowanych w latach 2019-2021 i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, pod wspólnym tytułem: „Biochemiczno-biofizyczne aspekty cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku cynku”. Możliwość przygotowania rozprawy doktorskiej w takiej formie jest zgodna z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, choć niejednokrotnie wzbudzała wiele wątpliwości i dyskusji w środowisku naukowym. Najczęściej zgłaszane wątpliwości dla tej formuły dotyczyły trudności w ocenie udziału doktoranta w tworzeniu pracy w przypadku artykułów wieloautorskich, które są dominujące w dziedzinie nauk biologicznych. Takie wątpliwości w przypadku przedstawionej mi do oceny rozprawy są zupełnie bezzasadne. Gdybym miała przedstawić przykład poprawnie przygotowanej pracy doktorskiej w tej właśnie formule, to bez żadnych wątpliwości mogłabym podać rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej jako wzorcową. Oceniana rozprawa to cykl pięciu tematycznie mocno związanych prac opublikowanych w dobrych czasopismach naukowych, z których pierwsza (praca A1) jest pracą przeglądową opublikowaną w International Journal of Environmental Health Research (IF: 3,411; punkty MNISW: 70). Pozostałe cztery publikacje prezentują dane oryginalne opublikowane w Acta Biochimica Polonica (praca A2) oraz w Journal of Applied Toxicology (prace A3, A4 i A5), o współczynniku oddziaływania IF odpowiednio 1,42 i 3,446 oraz punktacji ministerialnej odpowiednio 40 i 100. Wiodąca rola Doktorantki w powstawaniu tych prac nie budzi najmniejszych wątpliwości. We wszystkich publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszka Czyżowska jest pierwszym autorem, co zwykle w publikacjach z naszej dyscypliny naukowej jest wyznacznikiem wiodącej roli w przeprowadzaniu badań. Co więcej, jest również autorem korespondencyjnym w czterech z wymienionych prac, co z kolei świadczy niezbicie o znaczącym udziale Doktorantki w powstawaniu koncepcji badań oraz napisaniu samych artykułów. Potwierdzają to załączone oświadczenia wszystkich współautorów publikacji.

Reasumując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod względem formalnym jest bez zarzutów.

Ocena merytoryczna

Autoreferat mgr Agnieszki Czyżowskiej (napisany w języku polskim) poprzedzający teksty pięciu opublikowanych artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej liczy 47 stron maszynopisu, które obejmują (poza spisem treści): spis używanych skrótów, streszczenia (w języku polskim i angielskim), wprowadzenie, cele pracy, opis

materiałów i metod, omówienie wyników zawartych w publikacjach, główne wnioski oraz listę publikacji wchodzących w skład doktoratu. Zakończony jest przedstawieniem pozostałych osiągnięć naukowych doktorantki.

Indeks skrótów jest wyczerpujący i nie mam zastrzeżeń do większości z nich, choć nie bardzo rozumiem dlaczego np. skrót „PC” odpowiada „fosfatydylocholinom” (liczba mnoga), a „PS” to wg Autorki „fosfatydyloseryna” (liczba pojedyncza)? Wartościowym uzupełnieniem indeksu skrótów byłoby moim zdaniem podanie obok nazw polskich, pełnych nazw w języku angielskim, szczególnie dla skrótów, które pochodzą z języka angielskiego.

Pierwszym rozdziałem autoreferatu jest wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską wraz ich oceną bibliometryczną i opisem udziału Doktorantki w powstawaniu każdej z prac. Nie mam żadnych zastrzeżeń do tego opisu, natomiast chciałabym podkreślić wysoki, jak na rozprawę doktorską, sumaryczny IF = 15,199 oraz sumaryczną liczbę punktów MNiSW cyklu przedłożonych publikacji, które już były kilkanaście razy cytowane.

Rozdział „Wprowadzenie” to krótki komentarz autorski Doktorantki przedstawiający wstęp do przeprowadzonych badań, którego integralną część stanowi wspomniana wcześniej praca przeglądowa. Autorka zapoznaje czytelnika z tematyką wszechobecną we współczesnym świecie nanocząstek tlenku cynku opisując źródła ich powstawania, różnorodne właściwości, szerokie zastosowania, mechanizmy działania oraz potencjalne zagrożenia dla zdrowia ludzi, które mogą prowadzić do różnych schorzeń ogólnoustrojowych lub uszkodzeń narządów, wynikające z bezpośrednich kontaktów ZnO-NPs ze skórą, drogami oddechowymi i pokarmowymi człowieka lub wywołane skażeniem środowiska. Ta część rozprawy napisana jest przejrzysto i logicznie i prowadzi w jasny sposób do przedstawienia hipotez badawczych i celów pracy. W treści tego rozdziału zaintrygowało mnie stwierdzenie „właściwości inżynierskich nanocząstek ZnO”. Co Autorka rozumie pod tym pojęciem (które nie jest pojęciem powszechnie przyjętym w literaturze) i czy zdaniem Autorki właściwości naturalnych ZnO-NPs będą odmienne od tych dostępnych komercyjnie?

Następnie Pani Agnieszka Czyżowska przedstawia główny cel swoich badań, którym była „kompleksowa biochemiczna i biofizyczna analiza wpływu komercyjnych nanocząstek ZnO na wybrane komórki eukariotyczne” oraz jasno formułuje siedem celów szczegółowych.

W rozdziale „Materiały i metody” Autorka opisuje stosowane w badaniach nanocząstki tlenku cynku, „Materiał roślinny” i „Komórki ludzkie”, które wybrała do swoich badań (choć wśród nich wymienione są komórki mysiego czerniaka B16-F0) oraz stosowane metody. W opisie ZnO-NPs moją uwagę zwróciły wyniki analiz właściwości fizycznych nanocząstek stosowanych w badaniach, które, jak Autorka zaznaczyła w tekście (str. 17), odwołując się do danych zawartych w Tabeli 1 „wykonywano w wodzie dejonizowanej i pełnej pożywce do hodowli komórek”. Natomiast przedstawione w Tabeli 1 wyniki pomiarów średnicy hydrodynamicznej, wskaźnika polidispersyjności oraz potencjału zeta stosowanych ZnO-NPs odnoszą się do pomiarów przeprowadzonych w H₂O o pH = 8,8 oraz pożywce używanej do hodowli komórek o pH = 7,4. Skąd wynikają te niezgodności danych?

Czy przedstawione w tabeli dane to wyniki analiz wykonanych w H₂O o pH = 8,8 czy w H₂O dejonizowanej? Nasuwają mi się jeszcze pytania: czy sprawdzano właściwości fizyczne nanocząstek w H₂O o pH = 7,4 (które odpowiadałoby pH pożywki) oraz dlaczego pomiary właściwości ZnO-NPs w pożywce do hodowli komórek ludzkich prowadzono w temperaturze 25° C, a nie 37° C?

W dalszych częściach tego rozdziału Doktorantka opisuje szeroki zakres technik biofizycznych, biochemicznych, cytochemicznych oraz metod biologii komórki roślinnej i zwierzęcej, które wykorzystywała w swojej pracy. Metody te są bez wątpienia właściwie dobrane do rozwiązania problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej, natomiast opis niektórych z nich (np. testu żywotności komórek MTT) jest napisany w sposób niedający możliwości powtórzenia opisywanych doświadczeń, choćby ze względu na brak podania liczby komórek/cm² naczynia czy powierzchni dołka płytki doświadczalnej, do której dodawano określoną objętość odczynników reakcyjnych (np. 50µl MTT). Ponieważ wszystkie stosowane metody są poprawnie opisane w załączonych oryginalnych artykułach A2 - A5, zdaniem recenzenta lepszym sposobem ich przedstawienia w polskiej wersji rozprawy byłoby opisanie tylko celowości ich stosowania oraz zasady każdego testu wraz z odwołaniem do odpowiedniej pozycji literaturowej.

Kolejny rozdział „Omówienie wyników zawartych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską” napisany jest w sposób syntetyczny i klarowny i wskazuje, że Autorka w pełni zrealizowała wszystkie postawione sobie szczegółowe cele rozprawy, co zostało podsumowane w rozdziale „Główne wnioski”, po którym następuje „Spis literatury cytowanej w opisie cyklu publikacji”.

Do najważniejszych wyników przeprowadzonych przez mgr Agnieszkę Czyżowską badań można zaliczyć:

- 1) Wykazanie, że w hodowli *in vitro* ZnO-NPs działają cytotoksycznie na komórki roślinne (kalusa pszenicy dwóch badanych odmian), a ich cytotoksyczność zależy istotnie od wrażliwości komórek na stres środowiskowy i związana jest z indukcją reaktywnych form tlenu, które uszkadzają struktury komórkowe i prowadzą do śmierci komórek (praca A2).
- 2) Udowodnienie, że ZnO-NPs (w stężeniach niższych niż stosowane w bezpośrednim kontakcie z organizmem człowieka) działają cytotoksycznie na różne typy modelowych komórek ludzkiego układu immunologicznego, co może być efektem uszkodzenia mitochondriów i działania proapoptotycznego i/lub stymulacji peroksydacji lipidów błonowych przez badane nanocząstki (praca A3).
- 3) Pokazanie, że krótka ekspozycja komórek na promieniowanie UV-A nasila stopień cytotoksycznego działania ZnO-NPs, zarówno na komórki roślinne jak i zwierzęce (prace A2 i A3).

- 4) Wykazanie, że efektywność działania ZnO-NPs, na komórki ludzkie i zwierzęce, znacząco zależy od rodzaju komórki oraz stężenia nanocząstek i ich zdolności do agregacji oraz, że jony cynku uwalniane z nanocząstek w środowisku wodnym nie odgrywają istotnego znaczenia w mechanizmie ich cytotoksycznego działania (praca A4)
- 5) Określenie związku pomiędzy toksycznością ZnO-NPs a składem i strukturą monowarstw lipidowych błon plazmatycznych (prace A4 i A5)

Moim zdaniem szczególnie interesujące są nowatorskie badania oceny stopnia toksyczności ZnO-NPs oparte na ocenie oddziaływań nanocząstek z modelowymi warstwami lipidowymi utworzonymi z jednego rodzaju fosfolipidów (o jednakowych częściach polarnych) albo z mieszanin różnych lipidów imitujących skład lipidowy błon komórkowych.

Byłabym wdzięczna doktorantce za syntetyczne porównanie w czasie obrony stopnia toksyczności badanych ZnO-NPs na wybrane komórki oraz na syntetyczne warstwy lipidowe, których skład imitował skład dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej tych samych komórek. Czy zdaniem Autorki obecne w błonach komórkowych białka oraz reszty cukrowe glikolipidów i glikoprotein mogą mieć znaczący wpływ na cytotoksyczność nanocząstek tlenku cynku w odniesieniu do komórek ludzkich czy zwierzęcych?

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Pod względem edytorskim oceniana rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie. Nie budzi to większego zdziwienia ponieważ przedstawione wyniki zostały już opublikowane i od tej strony sprawdzone przez recenzentów i redakcje czasopism. Należy podkreślić, że w pracy przeglądowej (A1) przedstawiono kilka poglądowych rysunków i zbiorczych tabel świetnie wprowadzających w tematykę pracy, co bardzo ułatwia lekturę całej rozprawy doktorskiej. Dodatkowa część pracy, poza publikacjami, również została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Ma układ typowy dla prac doktorskich, jest napisana poprawnie po polsku, choć Autorce nie udało się unikać pewnych błędów interpunkcyjnych czy gramatycznych np. „ilość punktów” zamiast poprawnie „liczba punktów” (punkt to rzeczownik policzalny) oraz literówek, które zmieniając sens wyrazów utrudniają zrozumienie czytanego tekstu, np. „odmiany parzenicy” zamiast „odmiany pszenicy”, „wyniknięcia” zamiast „wniknięcia” i zapożyczeń z języka angielskiego, których należy unikać w artykułach pisanych po polsku np. „membrany komórek” zamiast „błony komórkowe”.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej oceniam bardzo wysoko. Chciałam zaznaczyć, że wszystkie przedstawione powyżej uwagi krytyczne i pytania w

[Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ](#)

żadnym stopniu nie obniżają całościowej oceny pracy doktorskiej. W moim przekonaniu Autorka uzyskała wartościowe, stanowiące nowość naukową wyniki badań wpływu nanocząstek tlenku cynku na komórki eukariotyczne, zarówno roślinne jak i zwierzęce, które przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmów cytotoksycznego działania tych związków i otwierają szerokie perspektywy badań molekularnych na przyszłość. Rezultaty badań Doktorantki dają też podstawę do koniecznej i starannej analizy zasadności powszechnego stosowania nanocząstek tlenku cynku (np. w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym czy rolnictwie). Wszechobecność ZnO-NPs w środowisku naturalnym może znacząco wpłynąć na produktywność upraw rolniczych, a ich bezpośrednie oddziaływania na organizm człowieka mogą być przyczyną wielu schorzeń.

Warto również podkreślić, że oprócz wyników badań przedstawionych w pracy doktorskiej Pani Agnieszka Czyżowska ma również znaczące inne osiągnięcia naukowe. Doktorantka jest autorem w pięciu opublikowanych pracach naukowych niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej (o łącznym IF = 17,924 i sumarycznej liczbie punktów MNiSW = 380) oraz siedmiu komunikatach zjazdowych przedstawionych na Ogólnopolskich Konferencjach Naukowych. Odbyła również dwa staże badawcze w Instytutach PAN.

Przedstawiona do oceny praca spełnia wszelkie wymogi rozprawy doktorskiej. Wnoszę zatem o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na bardzo wysoką wartość naukową rozprawy doktorskiej, wnoszę o rozważenie przez Wysoką Radę możliwości jej wyróżnienia.

/Marta Michalik/