

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 30.11.2021r.

Strona 1

Dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
Uniwersytet Gdański,
Tel.: +48 58 523 6305
Fax: +48 58 523 6426
E-mail: aleksandra.krolicka@ug.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej
zatytułowanej „Biochemiczno-biofizyczne aspekty cytotoksycznego
działania nanocząstek tlenku cynku”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Biochemii i Biofizyki, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Barbasz, prof. UP.

Rozprawa doktorska opiera się na pięciu oryginalnych publikacjach naukowych (jednej pracy przeglądowej i 4 pracach eksperymentalnych), które ukazały się drukiem w latach 2019 – 2021. Dodatkowo rozprawa doktorska zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, krótkiego wprowadzenia dotyczącego nanocząstek tlenku cynku, materiałów i metod, omówieniu uzyskanych w publikacjach wyników, najważniejszych wniosków i literatury. Na końcu rozprawy doktorskiej doktorantka zaprezentowała swoje pozostałe osiągnięcia w postaci innych publikacji, doniesień konferencyjnych i staży naukowych. Łączny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor, IF*) przedstawionych w pracy doktorskiej publikacji wynosi 15,199, co przekłada się na 410 punktów ministerialnych.

Na wstępie na uwagę zasługuje fakt, że w publikacjach przedstawionych do rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszka Czyżowska jest pierwszym autorem we wszystkich pracach, a w

czterech również jest autorem korespondencyjnym. Co więcej istotne jest również to, że wszystkie prace nie są wieloautorskie (trzy są 2-autorskie, a dwie 4-autorskie). Włączone przez mgr Agnieszkę Czyżowską do rozprawy doktorskiej publikacje stanowią ciąg przyczynowo-skutkowy i przedstawiają zagadnienia dotyczące biochemiczno-biofizycznych aspektów cytotoksycznego działania nanocząstek tlenku cynku (ZnO-NPs). Ze względu na fakt, że prace stanowiące rozprawę doktorską przed opublikowaniem były wnikliwie poddane procesowi recenzji (peer-review) oraz edycji, nie widzę więc potrzeby by je szczegółowo omawiać.

Obecna „Nano-era” i zachłyśnięcie się nanocząstkami czyli cząstkami koloidalnymi o wielkości mniejszej niż 100 nm w co najmniej jednym wymiarze spowodowało bardzo dynamiczny wzrost przemysłu nanotechnologicznego, a co za tym idzie uwolnieniem do środowiska znacznych ich ilości. Mimo ich ogromnych zalet i wykorzystania nanocząstek w niemal każdej dziedzinie życia, niosą one ze sobą niebezpieczeństwo w postaci toksycznego działania na organizmy żywe. Z tego też względu podjęcie badań biochemiczno-biofizycznych przez panią mgr Agnieszkę Czyżowską nad wpływem ZnO-NPs na wybrane komórki eukariotyczne (roślinne i ludzkie) uważam za w pełni uzasadnione. Temat podjęty przez Doktorantkę wydaje się niezmiernie ważny nie tylko z punktu widzenia poznawczego, lecz również może pozwolić na ograniczenie niekontrolowanej emisji nanocząstek do środowiska, które pośrednio bądź bezpośrednio mogą wpływać niekorzystnie na komórki eukariotyczne, co zresztą zostało wykazane przez Doktorantkę w trakcie jej badań. Oceniana przeze mnie praca doktorska porusza wiele aspektów dotyczących analizy toksyczności ZnO-NPs na komórkach eukariotycznych. Moim zdaniem bardzo celne było włączenie przez Doktorantkę modelu membran lipidowych, które to badania pozwoliły na określenie związku pomiędzy toksycznością ZnO-NPs, a zmianą składu i struktury lipidowej części membrany komórkowej. Pozwoliło to na wykazanie że stopień oddziaływania elektrostatycznego ZnO-NPs zależy jest od budowy polarnej części lipidu, a ładunek eksponowany na tej części lipidów jest skorelowany ze stopniem modyfikacji membrany przez nanocząstki. Dzięki zastosowaniu modelu membran lipidowych, badania mogły zostać opublikowane w postaci trzech publikacji naukowych

w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Applied Toxicology* (IF 3,446). Dzięki zastosowaniu szerokiego warsztatu badawczego pani mgr Agnieszka Czyżowska oceniła aktywność mitochondrialną, integralność błony, stopień utlenienia lipidów, indukcję stanu zapalnego i aktywację szlaku apoptozy, co pozwoliło jej na określenie różnic w odpowiedzi komórkowej na badane przez nią ZnO-NPs. Bardzo istotne i ważne w badaniach naukowych jest nie tylko stwierdzenie jakiegoś zjawiska zachodzącego w przyrodzie, ale również pokazanie mechanizmu działania i zrozumienie co dzieje się na poziomie komórkowym i jakie to niesie konsekwencje.

Podczas obrony pracy doktorskiej chciałabym poprosić Panią mgr Agnieszkę Czyżowską o przedyskutowanie kilku zagadnień i rozwianiu kilku moich wątpliwości, które pojawiły się podczas analizy jej dysertacji:

1. *Czy w kontekście oceny toksyczności ZnO-NPs na kalus pszenicy może Pani właściwie ocenić toksyczność nanocząstek na roślinę? Czy kalus roślinny jest dobrym modelem do badań w porównaniu z całą rośliną, bądź zawiesiną komórkową in vitro?*

2. *W przypadku badania wpływu wielkości nanocząstek na stopień toksyczności ZnO-NPs postąpiła Pani komercyjnie dostępnymi nanocząstkami z firmy Sigma-Aldrich (USA) i US Research Nanomaterials, Inc i na podstawie opisu produktu podała Pani wielkość badanych nanostruktur, aczkolwiek jak sama Pani napisała Rossi i in. w 2014 opisali że te nanostruktury w wodzie i w etanolu mają określoną średnią wielkość, która jest stosunkowo ściśle określona. W związku z powyższym mam pytanie czy przeprowadziła Pani pomiary wielkości nanocząstek użytych w eksperymentach? Jeśli tak, to jakie stosowała Pani metody? Jeśli nie, to dlaczego?*

3. *Jak można wyjaśnić fakt, że wielkość ZnO-NPs nie wpływa na ich toksyczność i działanie w porównaniu na przykład z nanocząstkami srebra?*

4. *Na Rycinie 1, obrazującej różnicę w składzie lipidowym membran komórek U-937 (monocyty), HL-60 (promielocyty) i B16-F0 (linia mysia czerniaka) oraz wpływu działania ZnO-NPs na te komórki zabrakło ludzkiej linii czerniaka COLO 679. Czy było to celowym działaniem?*

5. Czy uzyskane przez Panią wyniki badań dotyczące wpływu toksyczności ZnO-NPs na skład i strukturę lipidowej części membrany komórkowej mogą zostać wykorzystane w przyszłości do tworzenia nowych leków (np. przeciwnowotworowych)?

6. Jakie niebezpieczeństwo w interpretacji wyników i wnioskach płynących z eksperymentów niesie za sobą stosowanie uproszczonych modeli badawczych (na przykład monowarstw lipidowych uzyskanych techniką Langmuir'a)?

W podsumowaniu stwierdzam, że prezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki i ich interpretacja są wystarczającym materiałem dla uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Oświadczenia autorów wskazały, że wkład Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej w powstanie 5 prac stanowiących rozprawę doktorską był wiodący i znaczący (w 100% jest pierwszym autorem, a w 80% autorem korespondującym). Moim zdaniem Pani mgr Agnieszka Czyżowska uzyskała bardzo ciekawe wyniki wnoszące wartość naukową w dziedzinie szeroko pojętej nanotechnologii, a w tym wykazanie związku pomiędzy toksycznością ZnO-NPs, a zmianą składu i struktury lipidowej części membrany komórkowej. Zarówno ocena toksyczności ZnO-NPs w stosunku do ludzkiego układu immunologicznego, jak również ludzkich i mysich komórek czerniaka pozwoli na wykorzystanie wyników w medycynie. Z kolei zbadanie wpływu promieniowania ultrafioletowego na stopień toksyczności ZnO-NPs zwróci uwagę na zastosowanie tych nanostruktur w zastosowaniach kosmetycznych.

Na uwagę zasługuje również fakt, że Pani mgr Agnieszka Czyżowska jest również współautorem sześciu innych prac, które ukazały się w czasopismach o zasięgu międzynarodowym w latach 2019 – 2021. Świadczy to o szerokich zainteresowaniach badawczych Doktorantki, która dodatkowo odbyła 7 staży w ośrodkach krajowych i zagranicznych. Dzięki zdobyciu stypendium BioLAB Polsko-Amerykańskiej Komisji Fulbright'a przez 10 miesięcy mogła ona poszerzać swój warsztat naukowy w Van Remmen Laboratory, Aging & Metabolism Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA.

Uważam, że opisany udział Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej w powstanie pięciu prac naukowych o zasięgu międzynarodowym włączonych do rozprawy doktorskiej upoważnia mnie do stwierdzenia, że rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie naukowej. Na uwagę zasługuje również fakt, że cykl publikacji, które składają się na rozprawę doktorską zostały już zauważone przez środowisko naukowe i były cytowane 23-krotnie mimo faktu, że ukazały się drukiem stosunkowo niedawno, bo w latach 2019 – 2021.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Czyżowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na względzie wartość poznawczą zaprezentowanych przez nią badań oraz opublikowanie ich w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym wnoszę ponadto o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Zakład Badania Związków
Biologicznie Czynných



dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG