



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Michał Bijak, prof. WICiR
Katedra Biochemii Ogólnej
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 10.09.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Pudlarz pt.: „Analiza aktywności
biologicznej nanocząstek srebra i złota z unieruchomionymi enzymami
antyoksydacyjnymi *in vitro* i *in vivo*”**

Promotor pracy – Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Przedłożona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych jest cyklem tematycznych publikacji, na który składają się cztery prace naukowe w języku angielskim. Jest to jedna praca przeglądowa oraz trzy prace eksperymentalne. Trzy prace (dwie eksperymentalne oraz praca przeglądowa) zostały opublikowane w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports (JCR), natomiast jedna praca eksperymentalna jest wskazana jako publikacja znajdująca się na etapie recenzji w czasopiśmie „Nanomedicine”. We wszystkich przedstawionych pracach Doktorantka jest pierwszym Autorem jak również jest wskazana jako Autor korespondencyjny. Łączna punktacja opublikowanych prac włączonych w cykl stanowiący podstawę rozprawy doktorskiej stanowi 64 pkt. MNiSW według ujednoliconego wykazu z dnia 26.01.2017 oraz 180 pkt. MNiSW według wykazu z dnia 31.07.2019. Łączny współczynnik oddziaływań Impact Factor (wg. wykazu za rok 2018) dla opublikowanych prac wynosi 4,784. Wszystkie prace zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu naukowego OPUS 5, którego Kierownikiem jest promotor pracy doktorskiej prof. dr hab. Janusz Szemraj.

Skuteczność działania wielu leków, w tym także tych najnowszej generacji bywa ograniczona poprzez brak możliwości ich efektywnego transportu do komórek docelowych.

tel. +48 42 635 43 36

ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź

e-mail: michal.bijak@biol.uni.lodz.pl

 www.biol.uni.lodz.pl

Często również obserwuje się niekontrolowaną dystrybucję leków w organizmie, co wymaga stosowania dużych dawek, aby uzyskać spodziewany efekt terapeutyczny. Jednym z najbardziej obiecujących rozwiązań tych problemów wydają się być cząstki o wyjątkowych właściwościach fizykochemicznych zwane potocznie nanonośnikami.

Nanonośniki są ściśle związane z nanotechnologią, która opiera się na wytwarzaniu materiałów i struktur o rozmiarach do 100 nm. Nanotechnologia należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin nauki i techniki. Jest to dziedzina interdyscyplinarna, która łączy wieloaspektowe wątki różnych dziedzin w tym elementy fizyki ciała stałego, chemii, materiałoznawstwa, a także biochemii i biologii molekularnej. Głównym celem nanonośników jest umożliwienie terapii celowanej i kontrolowane dostarczanie leków. Nośnik użyty w tego typu terapii nie powinien posiadać właściwości toksycznych, powinien dobrze wiązać lek ale też umożliwić uwolnienie go w docelowym miejscu w stężeniu mieszczącym się w zakresie terapeutycznym. Ponadto użycie nanocząstek powinno wpływać na rozpuszczalność leku, jego czas retencji, możliwość przenikania przez błony biologicznej, jak również zwiększać jego odporność na działanie enzymów znajdujących się w płynach ustrojowych. Jednymi z bardzo obiecujących nanocząstek, które mogą znaleźć zastosowanie jako nanonośniki terapeutyków są metale szlachetne, w tym głównie złoto i srebro. Charakteryzują się one wysoką stabilnością, która pozwala na standaryzację otrzymywanych koniugatów lek-nanocząstka. W ciągu ostatnich lat opracowano i dopracowano również wiele metod otrzymywania nanocząstek złota i srebra, co pozwala na obniżenie kosztów produkcji i zwiększa szanse na włączenie ich do terapii klinicznych.

Stres oksydacyjny jest powszechnie występującym zjawiskiem związanym z metabolizmem energetycznym komórki, jednak ma on negatywny wpływ na organizm człowieka i przyczynia się do rozwoju wielu chorób, w tym nowotworów, cukrzycy, chorób układu krążenia, przewlekłej choroby nerek, chorób neurodegeneracyjnych. W warunkach zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu olbrzymie znaczenie ma ich inaktywacja przez enzymatyczny system ochrony, na który głównie składają się trzy enzymy antyoksydacyjne: dysmutaza nadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx) oraz katalaza (CAT). Jednak ze względu na skomplikowaną budowę białkową, enzymy te mają bardzo ograniczoną możliwość bezpośredniego zastosowania w przeciwdziałaniu zmianom powodowanym przez stres oksydacyjny. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę w ramach przedstawionej dysertacji wpisują się w nurt naukowy, który ma na celu praktyczne wykorzystanie nanocząstek w celu przeciwdziałania zmianom wywoływanym przez stres oksydacyjny, co ze

względu na możliwość przyszłego terapeutycznego zastosowania zasługuje na szczególną pochwałę.

Za cel główny realizowanych badań Doktorantka postawiła sobie stworzenie oraz określenie właściwości biologicznych koniugatów nanocząstek złota i srebra z enzymami antyoksydacyjnymi – dysmutazą ponadtlenkową oraz katalazą. Cel ten został rozbity na sześć celów szczegółowych, które zostały osiągnięte przez Doktorantkę w trakcie realizacji swoich badań. Bardzo ważnym elementem szeroko zakrojonych prac badawczych było zapoczątkowanie doświadczeń na poziomie *in vitro* aby następnie wykonać eksperymenty *in vivo* na modelu mysim.

We wprowadzeniu do pracy Doktorantka szczegółowo przedstawia zjawisko stresu oksydacyjnego wraz z systemem obrony organizmu przed reaktywnymi formami tlenu. Pozwala to zrozumieć cel prac badawczych podjętych w ramach dysertacji, które są ukierunkowane na dostarczanie do komórek dwóch najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych. Moim zdaniem w tej części zabrakło jedynie krótkiej informacji na temat promieniowania jonizującego, jako jednej z ważnych przyczyn powstawania stresu oksydacyjnego – ten czynnik pojawia się później w opisywanych badaniach prowadzonych na świecie. Dalsza część wprowadzenia przedstawia nanocząstki i ich potencjał jako elementy nośnikowe. W mojej ocenie całość wprowadzenia w sposób wyczerpujący przedstawia problematykę przedłożonej dysertacji.

Doktorantka bardzo płynnie porusza się w zagadnieniach związanych z wykorzystaniem różnego typu nanocząstek w tym srebra i złota w terapiach celowanych. Dowodem tego jest opublikowana i włączona w skład rozprawy doktorskiej praca przeglądowa, która bardzo szczegółowo i dogłębnie opisuje potencjał nanocząstek.

W toku prac badawczych Doktorantka opracowała biotechnologiczny model bakterii *E. coli* produkujący ludzką katalazę oraz dysmutazę ponadtlenkową. Skuteczność transformacji została potwierdzona metodą sekwencjonowania DNA plazmidowego jak również analizą produktu końcowego przy użyciu techniki Western-Blot. W przedłożonych do oceny pracach eksperymentalnych znajduje się opis metodyki transformacji bakterii i izolacji enzymów, jak również podana jest wydajność tego procesu, co może stanowić ważną wskazówkę ekonomiczną do prac wdrożeniowych. Kolejnym elementem prowadzonych badań była synteza nanocząstek srebra i złota, które następnie były wykorzystywane jako nośniki dla otrzymanych enzymów antyoksydacyjnych. W tym aspekcie Doktorantka dokonała szeroko zakrojonych prac, co pozwoliło na syntezę aż pięciu typów nanocząstek złota i czterech typów

nanocząstek srebra. Charakteryzując je Doktorantka podaje, iż różnią się one wymiarem, proponowałbym uściślić, że chodzi w tym przypadku o średnicę uzyskanych nanocząstek.

Doktorantka otrzymała szereg koniugatów enzym-nanocząstka o różnym stopniu pokrycia nanocząstki przez białko (66; 100 oraz 133%), moim zdaniem przydatna byłaby informacja, czy stopień pokrycia nośnika był weryfikowany empirycznie, czy został on obliczony teoretycznie. W dwóch opublikowanych pracach eksperymentalnych Doktorantka wykazała aktywność enzymatyczną katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej, co wskazuje na słuszność i funkcjonalność koncepcji opracowanego modelu nanocząstka-enzym. Jedyna moja uwaga dotyczy sposobu przedstawienia wyników zmiany aktywności w czasie, w mojej opinii bardziej czytelnym byłoby podanie wartości procentowych oprócz wartości bezwzględnych, co pozwoliłoby na lepsze porównanie układów pomiędzy sobą.

Opublikowane wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę posiadają wysoki potencjał naukowy umożliwiający ich kontynuację w bardziej skomplikowanych układach badawczych *in vitro* jak i *in vivo*. Bez wątplenia Doktorantka wykorzystała to w pracy, która obecnie znajduje się w procesie recenzji w czasopiśmie *Nanomedicine* i jednocześnie stanowi część składową dysertacji doktorskiej. W pracy tej Doktorantka przedstawia wyniki badań *in vivo* na modelu mysim, które na poziomie molekularnym wykazują efektywne działanie ochronne koniugatów nanocząstek z katalazą oraz z dysmutazą ponadtlenkową na zmiany oksydacyjne indukowane w skórze przez promieniowanie UV. Stanowi to bardzo ważny aspekt, gdyż uszkodzenia DNA wywoływane przez promieniowanie UV stanowią główną przyczynę nowotworów skóry. Moja uwaga do tej pracy jest jedynie natury edytorskiej, a mianowicie dotyczy ona figury nr 2, która nie odpowiada opisowi w tekście oraz podpisowi.

W zakończeniu rozprawy doktorskiej Doktorantka podsumowuje otrzymane wyniki w czytelny i syntetyczny sposób. Następnie, jako ostatni element pracy przedstawia Ona osiem wniosków, które konkludują badania oraz analizy odnosząc się do głównego celu postawionego w pracy doktorskiej, jak również w pełni odpowiadają na cele szczegółowe. Wnioski te jednoznacznie wskazują na ogromny potencjał wyników otrzymanych podczas realizacji pracy i mogą stanowić impuls do dalszych zakrojonych na szeroką skalę badań nad wykorzystaniem koniugatów nanocząstka-enzym antyoksydacyjny w terapiach celowanych w przypadku stanów patologicznych z zachwianą równowagą REDOX.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Pudlarz pt. „Analiza aktywności biologicznej nanocząstek srebra i złota z unieruchomionymi enzymami antyoksydacyjnymi *in vitro* i *in vivo*” posiada bardzo dużą

wartość poznawczą i bez wątpienia spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Moje uwagi przedstawione w recenzji nie wpływają na wartość merytoryczną pracy. Przedstawione wyniki badań wskazują na bardzo dobry warsztat metodologiczny Doktorantki, jak również szczególne zaangażowanie w prace naukowe, w związku z czym przekładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Pudlarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony pracy doktorskiej. Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie pracy.

UNIwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Biochemii Ogólnej
Michał Bijak
dr hab. Michał Bijak