

Katedra Patomorfologii UJ CM

ul. Grzegórzecka 16, 31-531 Kraków

Zakład Neuropatologii UJCM

ul. Kopernika 40, 30-001 Kraków

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Wykorzystanie zaawansowanych metod spektroskopowych do badania wpływu nanocząstek tlenków żelaza na organizmy żywe” mgr inż. Agnieszki Drózdź z Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Nanocząstki to wielce obiecujące - jeśli wolno użyć tego określenia – „medium” o zastosowaniach zarówno medycznych, w tym diagnostycznych, ale jeszcze bardziej leczniczych, jak również w badaniach ogólnobiologicznych o znaczeniu podstawowym. W chwili obecnej nasza wiedza na temat mechanizmów ich dystrybucji, transportu, przenikania przez bariery biologiczne, interakcji z biomolekułami powierzchni komórek, macierzy międzykomórkowej jak też wnętrza komórek jest jeszcze ciągle raczej w fazie „embrionalnej”.

Jako przedstawiciele nauk biomedycznych postrzegamy nanocząstki przede wszystkim jako potencjalne „medium” zdolne np. ułatwiać podawanie substancji leczniczych, takich jak rozmaite przeciwciała czy substancje aktywne metabolicznie (np. enzymatycznie), a nawet modyfikujące system ekspresji genów oraz dróg wewnątrzkomórkowej sygnalizacji z nieporównywalnie większą precyzją i selektywnością niż obecnie. Ale użycie nanocząstek wg mojej oceny wykracza nawet poza te przecież bardzo ambitne cele. Wystarczy zdać sobie sprawę, że nanocząstki podane do jakiegokolwiek układu biologicznego, czy to hodowli komórkowej, czy to żywego wielokomórkowego organizmu, są w oczywisty sposób „ciałem obcym”, a dokładniej „ultramikrociałem obcym”. Badanie w jaki sposób taki „ultramikroalien” oddziałuje z układem biologicznym może być źródłem wiedzy nie do przecenienia, także w perspektywie nieco odległej, ale coraz bardziej „majaczącej”, przed którą staje ludzkość, jaką może być np. rzeczywiste „zderzenie” z obcymi formami chemii i biologii do którego może dojść np. w badaniach marsa czy innych ciał niebieskich... Zasadnicze zręby wiedzy, które musimy zbudować to dokładne poznanie gdzie i w jaki sposób oraz w jakich ilościach docierają do struktur układu biologicznego nanocząstki, jak również co się z nimi dzieje po wnikięciu do żywego organizmu. Tu otwiera się

„pole poznania” interakcji nanocząstek i organizmu żywego, w które wkroczyła doktorantka stosując metody: TXRF i FTIR (tzw. fluorescencyjna spektroskopia rentgenowska, total reflection X-ray fluorescence, w skrócie: TXRF oraz mikrospektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera - Fourier transform infrared spectroscopy, w skrócie: FTIR) - jedne z najlepszych jakie współczesna metodologia badań biomedycznych stawia w dyspozycji badaczy. Doktorantka postanowiła ocenić biodystrybucję nanocząstek, oraz zmiany pierwiastkowe w wybranych narządach u zwierząt poddanych działaniu dwóch typów nanocząstek żelaza (IONP), a mian. opłaszczonych glikolem etylenowym oraz mannitolem, jak również odpowiedź biologiczną organizmu na podane nanocząstki poprzez ocenę zawartości określonych, wybranych biomolekuł (np. lipidy).

Przedstawiona do recenzji praca liczy 137 stron i ma typowy dla rozpraw naukowych układ, tj. składa się ze wstępu, celu i zakresu pracy, po którym następuje rozdział nazwany przez doktorantkę: „Nanocząstki tlenków żelaza – aktualny stan wiedzy”, a po nim kolejne rozdziały omawiające kolejno, materiał badawczy, metody badawcze i wyniki, przedstawienie i omówienie których (rozdział ten zawiera też dyskusję) zwieńcza podsumowanie. Dalej praca wzbogacona jest o osobno przedstawione materiały dodatkowe, spis rycin (34), spis tabel (łącznie 24), po którym umieszczono bibliografię. Całość kończy szczegółowo przedstawiony dorobek naukowy doktorantki, w którym wymieniono tytuły publikacji, referatów i posterów zjazdowych, otrzymane granty, oraz lista sesji badań w zagranicznych ośrodkach synchrotronowych. Spis piśmiennictwa obejmuje 242 pozycje, z tego naliczyłem 136 pozycji (większość) z najnowszej dekady czyli od roku 2010 włącznie, a 46 pozycji, to doniesienia naukowe najnowszej daty (począwszy od roku 2015 włącznie, w tym 7 z roku 2018).

Istotą pracy doktorantki były badania nad wpływem nanocząstek tlenków żelaza (iron oxide nanoparticles – IONPs) na organizm zwierząt (szczury rasy Wistar) z użyciem zaawansowanych metod spektroskopowych pozwalających na ocenę dystrybucji pierwiastków (w tym jonów żelaza) oraz biomolekuł, jakimi są tzw. fluorescencyjna spektroskopia rentgenowska (total reflection X-ray fluorescence, w skrócie: TXRF) oraz mikrospektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (Fourier transform infrared spectroscopy, w skrócie: FTIR).

Pierwszy zatem wniosek, który formułuję w tej recenzji jest taki, że doktorantka bardzo dobrze sformułowała zarówno ogólne jak i szczegółowe cele swych badań wybierając bardzo celny,

„gorący” naukowo obszar badań i znakomicie trafiając z wyborem metodologii, dodajmy, bardzo trudnej, wymagającej, ale też należącej do najwyższej rangi w badaniach biomedycznych.

W rozdziale zatytułowanym „Materiał badawczy” (nr 4) znajdujemy istotne informacje zarówno dotyczące zwierząt użytych do badań dystrybucji nanocząstek, charakterystykę zastosowanych nanocząstek, oraz metodologię przygotowania eksperymentów na zwierzętach i jakie narządy badano celem określenia wpływu podawania nanocząstek żelaza (Badano wątrobę, śledzionę, nerki, serce, mózg oraz dodatkowo osocze) zwierząt po podaniu nanocząstek oraz w grupie kontrolnej). Natomiast samą metodykę TXRF i FTIR szczegółowo opisano w osobnym rozdziale (nr 5). Oba te rozdziały są wystarczająco szczegółowe, a zarazem interesująco napisane.

We wspomnianych wyżej tkankach szczurów po odpowiednio 2, 24 godz., oraz po 7 dniach od podania dożylnego roztworu nanocząstek (i w grupach kontrolnych) Doktorantka badała metodą TXRF w w/w tkankach i osoczu poziomy następujących pierwiastków: Fe, Cu, Ca, Zn, a metodą FTIR z użyciem promieniowania synchrotronowego (ośrodek SOLEIL w Saint Aubin, Francja) zawartość biomolekuł. Metodyka jest adekwatna do zadań i szczegółowo omówiona. Nie znalazłem w niej nic, co budziłoby istotne wątpliwości. Wart szczególnego podkreślenia jest fakt, że Doktorantka zastosowała szczególnie zaawansowane technologicznie armamentarium laboratoryjne, ale przedstawiła zastosowane metody w sposób zrozumiały (choć nie bez nieodzownego wysiłku intelektualnego...; pominię tu drobną uwagę wyrażoną dalej) nawet dla kogoś, kto nie jest fizykiem czy przedstawicielem „fizyczno-matematycznej” części nauk przyrodniczych.

Dobrze przemyślany plan badań pozwolił na obserwację czasowej dynamiki biodystrybucji pierwiastków i w efekcie badania Doktorantki ujawniły istotne zmiany zawartości badanych pierwiastków w tkankach zwierząt po podaniu nanocząstek żelaza w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, przy czym ich biodystrybucja była odmienna dla nanocząstek opłaszczonych glikolem polietylenowym (PEG-IONP) i D-mannitolem (M-IONP), które różnią się rozmiarami (tzw. średnica hydrodynamiczna). Przedstawione wykresy podsumowujące wyniki ilościowe badań bardzo dobrze pokazują m.in. właśnie czasową dynamikę zmian stężeń badanych parametrów. Zgodnie z wysuniętymi hipotezami badawczymi autorka zaobserwowała znacznie dłuższe pozostawanie Fe pochodzącego z nanocząstek (PEG-IONP) w organizmie zwierząt w porównaniu z M-IONP. Odmiennie także reagowały tkanki zwierząt na nanocząstki żelaza opłaszczone PEG i D-mannitolem, o czym świadczą zmiany w zawartości innych pierwiastków (miedzi, wapnia i

cynku) oraz zawartości biomolekuł (ocenianych metodą FTIR). Spośród badanych narządów (oraz surowicy) tylko śledziona i mózg nie wykazywały znamiennych różnic akumulacji badanych pierwiastków w czasie, a mówiąc ściślej zaobserwowano pewne trendy zmian pierwiastków w mózgu, ale nieznamienne statystycznie. O ile chodzi o mózg, to jest to wynik raczej zgodny z oczekiwaniami (nie tylko na zasadzie jak to mówi się w języku angielskim : „educated guess” ale też biorąc pod uwagę już publikowane obserwacje, na które doktorantka także się powołała), jednak ten brak (przynajmniej) znamiennych różnic w śledzionie jest nieco zaskakujący. Nie jest też zaskakujące stwierdzenie różnic w takich narządach jak wątroba czy nerki i oczywiście surowica. W tym przypadku z kolei Doktorantka udowodniła przydatność zastosowanej metodologii badawczej, co jest nie mniej ważnym aspektem (i zarazem jednym z celów) jej pracy. Z pewnością mając pod uwagę wrażliwość mózgu na poziomy żelaza czy miedzi i dobrze poznaną rolę tych pierwiastków w patogenezie schorzeń mózgu wyniki doktorantki przynoszą optymistyczny argument jeśli chodzi o potencjalne uboczne skutki podawania leków sprzężonych z nanocząsteczkami. Ale dalsze badania są konieczne, bo przecież nie wolno wykluczyć, że może dochodzić do nawet dość znacznych zmian stężenia żelaza w mózgu, ale w znacznie zwężonej skali czasowej (minuty?, pierwsza godzina?). Doktorantka bierze pod uwagę możliwość zaburzenia bariery krew-mózg po podaniu nanocząstek, co jednak wg niżej podpisanego chyba jest mniej prawdopodobne niż możliwość „przeciekania” takich cząstek w miejscach o naturalnie obniżonej barierze (np. area postrema czy organ podsklepieniowy) ale być może także i w innych miejscach, dlatego bardzo słusznie zwraca w dyskusji uwagę na możliwość lokalnych zmian pierwiastkowych w mózgu, których wykrycie wymagałoby odmiennej metodologii. A zatem jest to oczywista wskazówka do przykładowego kierunku dalszych badań...

Badaniami zawartości biomolekuł wykrywalnych metodą FTIR (chodzi tu o lipidy, białka, związki z grupami fosforanowymi wykrywane poprzez charakterystyczną absorbcję określonej długości fali) Doktorantka objęła tkanki nerek i wątroby u zwierząt z podanymi nanocząsteczkami żelaza i kontrolnych, sprzężonych z D-mannitolem (niezależnie od badań składu pierwiastków). Wyniki ilościowe (pole powierzchni pasma absorpcji) uzupełniono przedstawieniem map wybranych biomolekuł pokazujących ich tkankową topografię dystrybucji i np. pozwalających odróżnić korę i rdzeń nerki. Szkoda, że w opisie wykresów i map absorpcji podano tylko wybrane długości fali, a nie wzbogacono opisem jaki typ molekuly reprezentuje dana długość fali. Utrudnia to zwłaszcza nieprofesjonalistycznie w tej dziedzinie zrozumienie otrzymanych wyników, gdyż wyjaśnienia musi poszukiwać w tekście pracy doktorskiej (albo oczywiście w odpowiedniej literaturze źródłowej). Ciekawym i ważnym spostrzeżeniem jest stwierdzenie spadku zawartości

białek oraz wzrost względnej ilości nienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych w wątrobie po 7 dniach od podania nanocząstek. Doktorantka sugeruje możliwość niepełnej reprezentatywności badanych fragmentów wątroby do stanu zawartości biomolekuł w całości narządu. Jest to wyraz (godnej pochwały) ostrożności w wyciąganiu wniosków przez Doktorantkę ale osobiście w to wątpię, gdyż jeśli pominąć procesy typu marskość, wątroba jest ogólnie morfologicznie/strukturalnie „homogenna”. Natomiast to raczej może być potencjalnie interesujące, czy nanocząsteczki mogą wywierać autentyczny wpływ na metabolizm lipidów indukując (w nieznanym, czysto hipotetycznym sposób) zmiany ich stopnia nasycenia, co może potencjalnie być wykorzystane w leczeniu lub profilaktyce miażdżycy...?

Podsumowując, uzyskane przez Doktorantkę wyniki są bardzo interesujące i o znaczeniu nie tylko poznawczym, ale dają cenne argumenty dla dalszych badań nad zastosowaniami nanocząstek. Przeprowadzona dyskusja jest rzeczowa, oparta i w odniesieniu o istotne dane z piśmiennictwa i wskazuje na naukową erudycję Doktorantki.

Raczej z „obowiązku recenzenckiego” odnotuję kilka uwag, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy Doktorantki.

UWAGI

1. Uwagi terminologiczne:

- a. Na stronie 15 pojawia się nieprecyzyjne określenie „przeciwciała PEG”. Powinno być „przeciwciała anty-PEG”
- b. Nie powinniśmy zapominać, że współodkrywcą tzw. komórek Kupffera był polski uczonec, patolog, *nota bene* kierownik Katedry Patomorfologii UJ – Tadeusz Browicz. Dlatego, właściwe jest kontynuowanie nie tylko „patriotycznej”, ale po prostu oddającej sprawiedliwość tradycji nazywania osiadłych makrofagów wątroby – komórkami Browicza-Kupffera (a niechby nawet - Kupffera-Browicza).
- c. Środki kontrastowe takie jak wspomniano na str. Resovist czy Feridex nie są „lekami”.
- d. Prawdopodobnie na skutek błędu typograficznego tzw. czas relaksacji podłużnej (w metodologii magnetycznego rezonansu jądrowego) został nieprawidłowo oznaczony symbolem T2 (str. 23).

- e. Zadaniem tzw. terapii celowanej jest nie tylko, jak to napisała doktorantka - selektywne podawanie leku do określonych anatomicznie zmienionych „obszarów organizmu” (określenie użyte przez doktorantkę) - ale wpływanie na dokładnie określone szlaki sygnalizacji między i wewnątrzkomórkowej lub szlaki metaboliczne, lub też oddziaływanie na komórki o ściśle zdefiniowanych cechach antygenowych albo nawet o charakterystycznym wzorcu ekspresji genów.
- f. Zamiast „serum” właściwsze użycie po prostu określenia surowica (na marginesie, obecnie w reklamach w języku polskim używa się słowa „serum” np. serum przeciwzmarszczkowe itp. Co jest chwytem marketingowym ale raczej drażni ucho biologa czy medyka)
- g. Ponadto (Str. 19) – użyto niezrozumiałego określenia „roztworzenie” (rdzenia nanocząstki). Chodziło o dekompozycję?

2. Uwagi typu „redakcyjnego”:

- a. Raczej niepotrzebnie doktorantka połączyła cele i jak to określiła „zakres pracy”, przy czym „zakres pracy” w tym przypadku w gruncie rzeczy jak gdyby dookreśla materiał i metody. Zabieg rozdzielenia „celów” i „zakresu” pracy niepotrzebnie zaciera jasność określenia istoty koncepcji badawczej, skądinąd ciekawej i bardzo ważnej poznawczo.
- b. Podobnie bardzo kompetentnie i zrozumiale napisany rozdział nr 3 („Nanocząsteczki tlenków żelaza – aktualny stan wiedzy”) powinien być po prostu częścią wstępu.
- c. Zdaniem niżej podpisanego dyskusja wyników niepotrzebnie została jak gdyby „schowana” w rozdziale nr 6, czyli w Wynikach.
- d. Wskazane byłoby poszerzenie opisów wykresów i map dystrybucji biomolekuł tak aby nie tylko zawierały podane charakterystyczne długości absorbowanych fal promieniowania podczerwonego, ale wyjaśnienia jakie konkretnie biomolekuły są reprezentowane przez elementy widma absorpcji (białka, i ich „podzbiory”, lipidy etc.)

Podsumowanie i wnioski recenzji:

Przedstawione uwagi nie umniejszają w najmniejszym stopniu znaczenia odkryć i dokonań Doktorantki i nie obniżają bardzo dobrą ocenę jakości pracy oraz wykazanej przez Doktorantkę rzetelności badawczej. Praca jest napisana logicznie, dobrze językowo i przejrzystie. Trzeba z całą mocą podkreślić złożoność metodologiczną badanych przez Doktorantkę zagadnień, z którymi musiała się zmierzyć. Zrobiła to bardzo dobrze, wykazując fachowość jak i głęboką znajomość przedmiotu oraz metodologii. Należy mieć nadzieję, że mgr inż. Agnieszka Drózdź w dalszej karierze zawodowej i naukowej będzie kontynuować badania nad zarówno biodystrybucją nanocząsteczek jak i ich interakcją z żywym organizmem, farmakokinetyką, a także nad ich zastosowaniami.

Całość lektury pracy doktorskiej jak i wyszczególniony dorobek naukowy przekonują, że w osobie mgr inż. Agnieszki Drózdź mamy do czynienia z kompetentnym badaczem o niemałym doświadczeniu zdobytym w kraju jak i zagranicą, potrafiącym stosować najnowocześniejsze metody badawcze, stawiać cenne hipotezy badawcze, dogłębnie interpretować wyniki, wyciągać logiczne wnioski.

Reasumując:

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, wobec czego zwracam się do Wydziału Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Drózdź do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto:

Z uwagi na istotne poznawcze walory pracy, a także nowatorskie zastosowanie metodologii spektroskopowych w badaniach nanocząstek, pozwalam sobie również złożyć wniosek o wyróżnienie będącej przedmiotem recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Drózdź.

Kraków, 2019-01-07


dr hab. med. Dariusz Adamek prof. UJ