

dr hab. Katarzyna Sobierajska, prof. UMed  
Zakład Molekularnych Mechanizmów Komórkowych  
Katedra Nauk Biomedycznych  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 15.08.2023 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Paciorek zatytułowanej „*Rola miRNA w toksyczności nanocząsteczek srebra*” przedstawionej Radzie Wydziału Biologii Uniwersytetu Łódzkiego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych

### Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Paciorek została wykonana w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki Instytutu Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Promotorem rozprawy jest dr hab. Agnieszka Grzelak.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja została przygotowana w formie monografii opisującej badania dotyczące roli miRNA w toksyczności nanocząsteczek srebra. Rozprawa składa się z następujących części: *Spisu treści* (4 strony), *Wykazu skrótów* (2 strony), *Wstępu* (42 strony), *Celu pracy* (1 strona), *Materiału wykorzystanego w pracy* (4 strony), *Metod* (20 stron), *Wyników* (50 stron), *Dyskusji* (23 strony), *Podsumowania* (4 strony), *Wniosków* (1 strony), *Streszczenia w języku polskim i angielskim* (po 5 stron), *Suplementów* (2 strony) i *Bibliografii* (15 stron) obejmującej 304 pozycje literaturowe, z czego co trzecia cytowana przez Doktorantkę publikacja ukazała się w ciągu ostatniego pięciolecia. Rozprawa doktorska liczy 167 stron, a jej układ jest typowy dla tego rodzaju prac.

## Opis i ocena merytoryczna rozprawy

*Wstęp* recenzowanej rozprawy doktorskiej został napisany przystępnym i zrozumiałym językiem. Kolejność omawianych treści, jak i szczegółowość ich opisu jest logiczny i w znaczącej części wyczerpujący. Doktorantka rozpoczyna rozdział od historii odkrycia cząsteczek micoRNA (miRNA), czyli małych cząsteczek RNA składających się z około 22 nukleotydów, które regulują ekspresję genów na poziomie postranskrypcyjnym. Następnie Doktorantka przechodzi do przedstawienia przeglądu literatury dotyczącej powstania cząstek miRNA i ich dojrzewania, po czym zgodnie z tytułem podrozdziału zaprezentowania wiedzy dotyczącej roli miRNA w regulacji procesów fizjologicznych. Po zapoznaniu się z treścią tego podrozdziału stwierdzam, że zabrakło tu jednak wspomnianego w tytule opisu procesów fizjologicznych, w które zaangażowane są miRNA. Po przytoczeniu dowodów na udział cząsteczek w regulacji napraw DNA i procesu lekooporności Doktorantka skupia się na wnikliwym opisie roli miRNA w procesach patologicznych np. czynności serca i układu sercowo-naczyniowego, wskazując na sekwencje odpowiedzialne za rozwój kardiomiopatii niedokrwiennej, rozstrzeniowej czy zwężenia aorty. Opisuje rolę miRNA w rozwoju chorób psychicznych w oparciu o korelację choroby dwubiegunowej z ekspresją miR-15b, miR-13 i miR652. Na koniec tej części *Wstępu* w kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawia rolę miRNA w regulacji procesu nowotworzenia i rozwoju guzów, ograniczając się jednakże jedynie do stwierdzania, że sekwencje te mogą odgrywać rolę w przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej, opisaną w pracy jako przejście epitelialno-mezenchymalne. W kolejnym podrozdziale Doktorantka dokonuje przeglądu obecnej wiedzy na temat epigenetycznych mechanizmów rozwoju nowotworu. Rozdział ten jest dobrze opisany, niemniej jednak dopiero tutaj możemy znaleźć informację o roli miRNA np. miR-101 w regulacji poziomu E-kadheryny a w konsekwencji poprzez wzrost białka ZEB1 zmiany fenotypu komórek nowotworowych na mezenchymalny. Informacje te w mojej opinii powinny znaleźć się w części wcześniejszej *Wstępu*.



Następnie Doktorantka przechodzi do opisu mechanizmów modulacji miRNA w komórkach nowotworowych. Wybór przedstawionych tu publikacji opiera się na założeniu, że przywrócenie prawidłowej aktywności miRNA mogłaby prowadzić do odwrócenia fenotyp komórek nowotworowych, a przez to przyczynić się do przywrócenia homeostazy w zmienionej tkance. Należy zauważyć, że podrozdział ten jest bogato udokumentowany i prowadzony w sposób interesujący dla czytelnika. Podobnie jak kolejny, który przedstawia dowody na postrzeganie cząsteczek miRNA jako markerów prognostycznych, diagnostycznych a nawet celów terapeutycznych w leczeniu nowotworów.

W kolejnej części *Wstępu* Doktorantka skupia się na opisie roli nanomateriałów, w tym rolę srebra nanocząsteczkowego w homeostazie komórki, jak i organizmu. Przedstawia dowody i związane z tym obawy szerokiego stosowania nanocząsteczek srebra, skupiając się na jego zastosowaniu medycznym. W ostatniej części Doktorantka przechodzi do opisu stresu oksydacyjnego jako czynnika sygnałowego. W moim odczuciu ten podrozdział jest wprowadzony w sposób dość zaskakujący, niewynikający z dotąd konsekwentnie i logicznie prowadzonego *Wstępu*. Także jego zakończenie nie prowadzi czytelnika w sposób oczywisty do przedstawionych w kolejnej części trzech głównych celów badawcze rozprawy. Należy jednak podkreślić, że pomimo tego lekkiego dysonansu, są one dobrze sprecyzowane.

Pierwszym *Celem* pracy doktorskiej stała się ocena wpływu nanocząsteczek srebra na komórki o zróżnicowanym fenotypie metabolicznym, Kolejnym ocena wpływu nanocząsteczek srebra na profil miRNA istotnych w powstaniu i progresji nowotworów, a ostatnim ocena wpływu modulacji miRNA na fenotyp komórek poddanych toksycznemu działaniu nanocząsteczek srebra.

Swoje badania Doktorantka oparła o jedną linię komórkową Hep G2 (ludzkie komórki raka wątroby) hodowaną w pożywkach o różnej zawartości glukozy (odpowiednio  $25,0 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> oraz  $5,5 \cdot 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup>). Doktorantka uzasadnia wybór linii jako odpowiedniej do transfekcji i badań toksykologicznych. Dodatkowo w pierwszym podrozdziale *Wyników* czytelnik może znaleźć informację, że linia Hep G2 została wybrana do badań ze względu na wcześniej

udokumentowaną aktywność względem niej nanocząsteczek srebra. Sugerowałabym przeniesienie tej istotnej informacji do rozdziału *Materiały zastosowane w pracy* ewentualnie *Metody*.

Zarówno linia komórkowa jak i warunki hodowli zostały opisane przez Doktorantkę w sposób bardzo szczegółowy i wyczerpujący w rozdziałach *Materiały wykorzystane w pracy* oraz *Metody*. Jednakże w mojej opinii liczba badanych linii powinna zostać zwiększona, by pokazać uniwersalność lub brak uniwersalności uzyskanych wyników prowadzonych badań. Szczególnie, że we wspomnianym powyżej podrozdziale *Wyników* Doktorantka wskazuje, że w literaturze wykazano toksyczne działanie nanocząsteczek srebra względem licznych linii komórkowych o różnym pochodzeniu.

Opis *Materiałów zastosowanych w pracy* jak i *Metod* jest bardzo dobrze przygotowany. Wszystkie wykorzystane w badaniach procedury opisane są bardzo szczegółowo. Wskazanie pochodzenia wszystkich stosowanych odczynników wraz z informacją o ich numerach katalogowych stanowi cenne źródło informacji i pozwala na odtworzenie eksperymentów zarówno w laboratorium macierzystym jak i każdym innym. W opisie znalazłam dwie drobne niejasności, które należało by doprecyzować. Jedną z nich jest zalecenie przy ocenie potencjału inwazyjnego komórek pozostawienia do wyschnięcia przez 24 godziny wkładów membranowych, po uprzednim oczyszczeniu ich patyczkami higienicznymi. Moja druga uwaga dotyczy braku doprecyzowania, którą z nakładek do programu ImageJ posłużyła się Doktorantka w ocenie testu zarastania rysy. Te drobne uwagi nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę tej części dysertacji. Wybrane przez Doktorantkę metody doświadczalne pozwalają na weryfikację analizowanych przez nią problemów badawczych. Ich różnorodność i liczba pozwalają mi wysoko ocenić warsztat metodyczny Doktorantki oraz jej wnikliwość badawczą. Oprócz metod podstawowych jak opis hodowli linii komórkowej, czytelnik znajdzie tu opis oceny cytotoksyczności działania nanocząsteczek srebra, metodę oceny potencjału proliferacyjnego czy inwazyjnego komórek. W tym ostatnim sugerowałabym dołączenie schematu pozwalającego na łatwiejsze zrozumienie czasu trwania poszczególnych etapów



eksperymentu. Doktoranta opisała także stosowane przez nią metody analizy cyklu komórkowego, oceny poziomu białek techniką Western-blot, oceny generacji reaktywnych form tlenu czy zawartości NADP i NADPH w komórkach. Czytelnik znajdzie tu także opis metody analizy poziomu ekspresji panelu miRNA, pomiaru potencjału błony mitochondrialnej oraz pomiar poziomu ATP w badanej linii komórkowej. Doceniam także fakt, że badania prowadzone na linii komórkowej zostały częściowo zweryfikowane na modelu zwierzęcym.

W kolejnym rozdziale *Wyniki* Doktorantka przedstawia osiągnięte rezultaty swojej pracy w sposób bardzo szczegółowy. W mojej opinii w części tej znalazło się kilka niedociągnięć i błędów w sposobie przedstawienia wyników. Szybkość proliferacji została przedstawiona w formie tabeli, a nie wykresów co znacząco utrudnia czytelnikowi analizę tej części pracy (Tabela 2). Zdjęcia zamieszczone na Rysunku 10 przedstawiają raczej morfologię grupy komórek/kolonii a nie komórek jako takich, a w przypadku hodowli prowadzonej z mniejszą zawartością glukozy jest ono bardzo niskiej jakości. Wynik analizy potencjału inwazyjnego komórek (Rysunek 11, Rysunek 13) został przedstawiony w postaci % powierzchni wkładu membranowego zajętego przez komórki. Sądzę, że jest to podyktowane faktem bardzo dużej liczby komórek, które przeszły przez barierę, szczególnie w przypadku tych hodowanych przy niższym stężeniu glukozy. Chciałabym by Doktorantka odniosła się tutaj do mojej wątpliwości co do zasadności takiego podejścia. W mojej opinii projektując doświadczenie można było dobrać warunki eksperymentu tak, by liczba komórek przechodzących była niższa i aby w każdym przypadku przechodziły one pojedynczo. Pozwalało by to na precyzyjne policzenie ich liczby, a przez to na dokładniejszą ocenę zmian spowodowanych zarówno modulacją poziomu glukozy w pożywce jak i wpływu nanocząsteczek srebra na potencjał inwazyjny komórek. Zaproponowane w dysertacji podejście Doktorantki zafałszowuje wynik, gdyż część komórek zachodząc na siebie powoduje że odsetek powierzchni zajęty przez nie jest mniejszy niż gdyby każda z nich położona i policzona została oddzielnie. A zatem obserwowana przez Doktorantkę zmiana oceniona jej metodą jest mniejsza niż ma to *de facto* miejsce w rzeczywistości. Ze względu na obowiązek recenzencki muszę także nadmienić, że

przedstawienie reprezentacyjnego fragmentu uzyskanych zdjęć w większym powiększeniu byłoby dla czytelnika wygodniejsze w samodzielnej ocenie uzyskanych zmian potencjału inwazyjnego badanych komórek (Rysunek 12 i Rysunek 14).

Następnie Doktorantka przedstawia wyniki analizy potencjału migracyjnego komórek w oparciu o metodę zarastania rasy. Bardzo proszę o wyjaśnienie dlaczego więc analiza wyników podpisana została jako intensywność przejścia epitalialno-mezenchymalnego? Ponadto chciałabym prosić Doktorantkę o odpowiedź na moje pytanie, dlaczego podjęła decyzję by wyniki tej części swoich analiz przedstawić w formie logarytmu z krotności zmiany pola powierzchni rasy, a nie jako zmianę. Niestety przedstawione w tej części fotografie są bardzo trudne do samodzielnej interpretacji i oceny ze względu na ich bardzo niską jakość, szczególnie w przypadku tych przedstawionych na Rysunku 18. Wymienione uwagi obniżają moją ogólnie pozytywną ocenę merytoryczną recenzowanej rozprawy. Mam jednak nadzieję, że wyjaśnienie wątpliwości i korekta błędów pomoże doktorantce przygotować materiał zawarty w dysertacji do publikacji w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu.

Kończąc analizę przedstawionej pracy chciałabym podkreślić, że jest ona napisana bardzo starannie i zawiera jedynie nieliczne błędy edytorskie.

#### Wniosek końcowy

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Pauliny Paciorek. w pełni odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Pauliny Paciorek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



dr hab., Katarzyna Sobierajska

dr hab. Katarzyna Sobierajska, prof. UMed  
Zakład Molekularnych Mechanizmów Komórkowych  
92-215 Łódź | ul. Mazowiecka 6/8  
e-mail: katarzyna.sobierajska@umed.lodz.pl  
www.umed.pl