

Warszawa, 27.07.2023 r.

Dr hab. Kamil Brzoska, prof. IChTJ
Zakład Naukowy – Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: k.brzoska@ichtj.waw.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Paciorek pt. „Rola miRNA w toksyczności nanocząstek srebra”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Patrycji Paciorek została wykonana pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Grzelak w Katedrze Biologii Nowotworów i Epigenetyki Instytutu Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania będące podstawą pracy zostały sfinansowane w ramach programu „Diamentowy Grant” Ministerstwa Edukacji i Nauki.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy mechanizmów toksyczności nanocząstek srebra w komórkach ssaków oraz roli mechanizmu interferencji RNA w tym procesie. Nanotechnologia to jedna z najbardziej obiecujących technologii XXI wieku. Zajmuje się ona projektowaniem, wytwarzaniem oraz wykorzystaniem obiektów w skali nanometrycznej. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem zdobyczy nanotechnologii m.in. w medycynie jako czynników diagnostycznych i terapeutycznych. Rosnące wykorzystanie nanomateriałów w różnych gałęziach medycyny i przemysłu rodzi potrzebę szczegółowego poznania mechanizmów ich oddziaływania z układami biologicznymi, w tym ich wpływu na organizm człowieka. Badania w tym zakresie prowadzone są na całym świecie od lat, jednak wiele aspektów oddziaływania nanomateriałów na organizmy żywe wciąż pozostaje niejasnych. Szczególnie intensywne badania prowadzone są w związku z projektowaniem nowych, bazujących na osiągnięciach nanotechnologii, terapii antynowotworowych i metod diagnostyki onkologicznej.

Stosunkowo słabo poznanym aspektem oddziaływania nanomateriałów z organizmami żywymi jest udział mechanizmów epigenetycznych w tym procesie. Mechanizmy epigenetyczne warunkują powstawanie modyfikacji fenotypu komórki, które mogą być dziedziczone choć nie są związane ze zmianami sekwencji DNA. Przykładami takich mechanizmów są: metylacja DNA, modyfikacje histonów, oraz ekspresja niekodującego RNA, którego jedną z klas są cząsteczki miRNA regulujące ekspresję genów w procesie tzw. interferencji RNA. Wiadomo, że czynniki środowiskowe, w tym ksenobiotyki, mogą modyfikować epigenom komórek co z jednej strony może przyczyniać się do rozwoju różnych schorzeń, ale z drugiej strony może być wykorzystane do opracowania nowych leków i terapii dających nadzieję na skuteczniejsze leczenie m.in. chorób nowotworowych, które są obecnie ogromnym problemem zdrowotnym w skali globalnej. Wiadomo, że nanomateriały, w tym nanocząstki srebra, mogą wywoływać zmiany metylacji DNA, modyfikacji histonów oraz ekspresji miRNA, jednak znaczenie i konsekwencje tych zmian dla funkcjonowania komórek i organizmów nie zostały jeszcze do końca wyjaśnione. Celem recenzowanej pracy było zbadanie znaczenia wybranych miRNA w odpowiedzi na nanocząstki srebra w komórkach o różnym fenotypie metabolicznym oraz przetestowanie hipotezy mówiącej, że modyfikacja poziomu wybranych miRNA jest sposobem na modulację odpowiedzi komórek na nanomateriały. Wybór nanocząstek srebra jako modelowego nanomateriału jest bardzo trafny, gdyż jest to jeden z najczęściej wykorzystywanych nanomateriałów z ogromnym potencjałem zastosowania w przemyśle i biomedycynie. Uważam, że opisana powyżej tematyka oraz związane z nią cele recenzowanej pracy są niezmiernie ważnymi i aktualnymi zagadnieniami badawczymi, wobec czego wybór przez Doktorantkę tematyki badań uważam za bardzo interesujący i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana jest w sposób klasyczny i składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu zakończonym wyszczególnieniem celów pracy, rozdziałów o materiałach i metodach, opisu wyników oraz ich dyskusji zakończonej wnioskami. Na końcu pracy znajduje się dobrze dobrana i bogata bibliografia obejmująca 304 pozycje, potwierdzająca bardzo dobre obeznanie Autorki z literaturą przedmiotu. Rozprawa zawiera również suplement ze szczegółowymi wynikami oznaczenia ekspresji miRNA w tkankach zwierząt, którym podawane były nanocząstki srebra. Dołączone do pracy streszczenia w języku polskim i angielskim dobrze oddają jej charakter i nie budzą zastrzeżeń.

We wstępie Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę pracy zaczynając od historii odkrycia cząsteczek miRNA, mechanizmów ich działania, oraz ich potencjału diagnostycznego i terapeutycznego. Następnie przechodzi do charakterystyki nanomateriałów i ich wpływu na homeostazę komórkową, po czym omawia zjawisko stresu oksydacyjnego oraz jego rolę jako czynnika sygnałowego. Wstęp pracy jest w większości napisany jasno, przejrzysto i dobrze przygotowuje czytelnika do zapoznania się z wynikami pracy. Miejscami nie jest jednak do końca jasne w jaki sposób poszczególne podrozdziały łączą się ze sobą. Przykładowo, Doktorantka powinna bardziej uwypuklić fakt, że przejście do omówienia stresu oksydacyjnego tuż po omówieniu wpływu nanomateriałów na homeostazę wynika z faktu, że nanomateriały mogą wywoływać stres oksydacyjny. Wstęp byłby również bardziej przystępny i łatwiejszy w odbiorze, gdyby Autorka pokusiła się o wykorzystanie schematów, rysunków lub tabel aby przedstawić w formie graficznej omawiane mechanizmy (np. mechanizm interferencji RNA) lub podsumować przytoczone dane. Doktorantka nie ustrzegła się kilku drobnych nieścisłości i niejasnych stwierdzeń które przytaczam poniżej:

- Na stronie 18 mgr Paciorek stwierdza, iż „Metylacja DNA polega na przyłączeniu grup metylowych do DNA w obszarach wysp CpG”. Nie jest to stwierdzenie precyzyjne, ponieważ metylacja DNA może zachodzić również poza wyspami CpG.
- Niejasne jest następujące stwierdzenie ze strony 19: „zniesienie ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego inicjacji apoptozy”. Czym są inhibitory cyklu komórkowego inicjacji apoptozy?
- Na str. 30 Doktorantka stwierdza, że „w komórkach wykształciły się systemy pobierania nanocząstek uwzględniające ich cechy fizyczne i chemiczne”. Czy rzeczywiście istnieją specyficzne systemy komórkowe dedykowane pobieraniu nanocząstek jak sugeruje przytoczone zdanie? Na tej samej stronie Autorka stwierdza, iż „potencjał terapeutyczny zaowocował wykorzystaniem nanosrebra w produktach i urządzeniach medycznych, ale również w przemyśle np. w tkaninach oraz opakowaniach na żywność”. Według mojej wiedzy, popularność nanosrebra jest związana głównie z jego właściwościami antybakteryjnymi, co niekoniecznie jest równoznaczne z potencjałem terapeutycznym, chyba, że mamy na myśli wykorzystanie nanosrebra do leczenia infekcji bakteryjnych.

Wstęp dysertacji zakończony jest wyszczególnieniem trzech celów pracy, które są sformułowane poprawnie. Pojawia się tu informacja, że badania będą prowadzone na komórkach o różnym fenotypie metabolicznym ale brak wyjaśnienia na czym te różnice polegają. Moim zdaniem, informacja na temat tego o jakie różnice chodzi i dlaczego mogą one być istotne w kontekście toksyczności nanocząstek srebra powinna znaleźć się we wstępie pracy aby ułatwić czytelnikowi podążanie za tokiem rozumowania Autorki. Ponadto, przy okazji opisu celów pracy Doktorantka stwierdza, iż „zaplanowane doświadczenia pozwoliły na określenie następujących celów pracy”. Jest to sformułowanie niefortunne, ponieważ to określone cele pracy powinny być punktem wyjścia do zaplanowania doświadczeń a nie na odwrót.

W rozdziałach 3 i 4 pracy, mgr Paciorek bardzo szczegółowo opisała stosowane przez siebie techniki badawcze, co ułatwiło późniejsze śledzenie otrzymanych wyników. Moją konsternację wzbudził tylko jeden aspekt związany z wykonaniem testu zdolności do tworzenia kolonii opisanego na str. 46. Doktorantka stwierdza tam, że „Hodowlę kontynuowano przez kolejne cztery doby. Przez cały czas trwania eksperymentu medium kondycjonowane wymieniano na świeże co 24 godziny”. Czy codzienna zmiana medium w trakcie testu nie skutkuje rozsiewaniem komórek i sztucznym zwiększeniem liczby obserwowanych kolonii?

Dokumentacja otrzymanych wyników zajmuje 50 stron, na których autorka szczegółowo przedstawia rezultaty swoich badań zaczynając od analizy toksyczności nanocząstek srebra, a następnie przechodząc do badania ekspresji miRNA oraz oceny możliwości modulowania odpowiedzi komórek na nanocząstki srebra poprzez zmianę poziomu wybranych miRNA. Wyniki są przedstawione w większości jasno i klarownie z wykorzystaniem licznych tabel i wykresów. Moje uwagi do tej części pracy są następujące:

- W tabeli 1 zestawiono wartości IC50 dla komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra w różnych pożywkach. W opisie tabeli jest informacja, że wyniki były porównywane testem t-Studenta, ale nie została podana wartość „p” otrzymana jako wynik tego testu, co pozostawia czytelnika w niepewności co do statystycznej istotności obserwowanej różnicy.
- Ważnym etapem prowadzonych badań była analiza ekspresji miRNA pod wpływem nanocząstek srebra opisana na str. 66-68. Z uwagi na znaczenie tej analizy dla dalszych etapów badań, opis jej wyników powinien być uzupełniony o tabelę pokazującą zmianę ekspresji dla każdego badanego miRNA. Ułatwiłoby to czytelnikowi szybkie zidentyfikowanie tych miRNA, które mają największe znaczenie dla efektów oddziaływania

nanosrebra na komórki. Ponadto, na stronie 68 Doktorantka stwierdza, że do dalszych badań wytypowano miRNA, których ekspresja uległa obniżeniu pod wpływem działania nanocząstek ale nie podaje które konkretnie miRNA ma na myśli.

- Na stronie 69, Autorka stwierdza, że „zmiany w przeżywalności komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra zaczęto zauważać dopiero przy 30 nmol/dm³ stężeniu niektórych z syntetycznych analogów miRNA” ale nie przedstawia żadnych danych na których oparte jest to stwierdzenie. Nie jest również jasne, w jaki sposób stwierdzenie to wiąże się z zamieszczoną poniżej tabelą, gdyż tabela ta nie zawiera żadnej legendy i nie jest jasne jak należy ją rozumieć.
- Na str. 71 Doktorantka słusznie stwierdza, że niezwykle ważną rzeczą jest potwierdzenie na poziomie docelowych białek efektywności transfekcji i skuteczności działania wykorzystywanych syntetycznych analogów miRNA. Doktorantka testowała skuteczność działania używanych analogów miRNA poprzez analizę poziomu białek markerowych wytypowanych na podstawie kwerendy literaturowej oraz baz danych. Co zaskakujące, spadek poziomu białek markerowych zaobserwowano jedynie w przypadku dwóch analogów miRNA. Myślę, że warto byłoby uzupełnić tę analizę o pomiar poziomu mRNA związanego z badanymi białkami markerowymi oraz wykorzystanie kontroli negatywnej, czyli miRNA, które nie wycisza żadnego genu (tzw. scrambled miRNA).
- Na str. 76 Autorka stwierdza, że miRNA działają na mechanizmy komórkowe synergistycznie, ale nie przytacza żadnych danych ani odnośników literaturowych potwierdzających to stwierdzenie.
- Zbyt dużym skrótem myślowym jest stwierdzenie zawarte w opisie Rys. 15, mówiące iż przedstawia on intensywność przejścia epitelialno-mezenchymalnego. Rysunek ten przedstawia wyniki testu zarastania rasy mierzącego zdolność komórek do migracji, co niekoniecznie jest równoznaczne z przejściem epitelialno-mezenchymalnym.
- W niektórych przypadkach nie jest jasne, czy obserwowane różnice między badanymi grupami są istotne statystycznie. Jest tak np. w przypadku wyników analizy cyklu komórkowego przedstawionych na Rys. 23 i omówionych na str. 97-98. Podobnie sytuacja ma się z danymi przedstawionymi na Rys. 25, gdzie nie jest jasne czy różnica w odsetku komórek apoptotycznych jest istotna statystycznie czy też nie.

- Na str. 111, przy opisie wyników analizy ekspresji miRNA *in vivo*, brak informacji na temat tego jaki był czas traktowania nanocząstkami. Opis doświadczenia na str. 61 wskazuje, że zwierzęta były poddawane eutanazji w pierwszym, siódmym, lub 28 dniu doświadczenia ale nie podano informacji, który punkt czasowy był wybrany do analizy ekspresji miRNA.

Dyskusja wyników zawarta jest w 22-stronnicowym omówieniu, w którym Doktorantka w sposób dojrzały interpretuje własne wyniki i odnosi je do badań innych autorów. Nie ustrzegła się jednak pewnych niejasności np. nie jest dla mnie jasne co miała na myśli stwierdzając na str. 120, iż „Spadek liczby komórek w połączeniu ze wzrostem liczby kolonii w odpowiedzi na działanie nanocząstek srebra może być związany z promowaniem przez nanocząstki srebra przejścia epitelialno-mezenchymalnego”. W jaki sposób przejście epitelialno-mezenchymalne może powodować wzrost liczby kolonii przy jednoczesnym spadku liczby komórek? Dyskusja wyników kończy się bardzo dobrze napisanym podsumowaniem, w którym Doktorantka zwraca uwagę m.in. na fakt, że „znajdujące się w literaturze opisy wielu komórkowych procesów metabolicznych dotyczą konkretnego stanu metabolicznego, a przy braku informacji na temat warunków hodowlanych, są trudne w interpretacji i mogą być przyczyną pozornych sprzeczności”. Należy w tym kontekście wskazać na istotną zaletę ocenianej pracy polegającą na wykazaniu, że odpowiedź komórki na czynnik toksyczny może się znacznie różnić w zależności od jej profilu metabolicznego. Opisane przez Doktorantkę różnice w odpowiedzi komórek na nanocząstki związane ze zmianami stężenia glukozy mogą być istotne w kontekście stosowania technik diagnostycznych i terapeutycznych opartych na nanocząstkach u chorych na choroby cywilizacyjne takie jak cukrzyca.

Dysertacja kończy się sformułowaniem w sposób jasny i przejrzysty 7 wniosków z przeprowadzonych badań, z których najistotniejszym wydaje się być potwierdzenie możliwości modulowania odpowiedzi komórek na nanocząstki poprzez sztuczną zmianę poziomu odpowiednich miRNA.

Należy ubolewać, że wyniki opisanych w pracy badań nie zostały do tej pory opublikowane, gdyż z pewnością spotkałyby się z zainteresowaniem społeczności naukowej zajmującej się badaniem mechanizmów oddziaływania nanomateriałów z układami biologicznymi. Pozostaje mi mieć nadzieję, że niedociągnięcie to zostanie wkrótce naprawione i wyniki zostaną opublikowane, do czego gorąco Doktorantkę i jej współpracowników zachęcam.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Patrycji Paciorek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego wzbogacające naszą wiedzę o mechanizmach oddziaływania nanomateriałów z komórkami ssaków, a w szczególności o udziale miRNA w tym procesie oraz o możliwości modulowania odpowiedzi komórek na nanomateriały poprzez manipulowanie poziomem miRNA. Autorka wykazała się wnikliwością badawczą, umiejętnym wykorzystaniem szerokiego spektrum technik eksperymentalnych oraz umiejętnością interpretacji wyników. Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Mimo przedstawionych uwag krytycznych, rozprawa spełnia wszystkie warunki określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z powyższym, wnioskuję o dopuszczenie mgr Patrycji Paciorek do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Dr hab. Kamil Brzóska, prof. IChTJ