



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Sikorskiej
pt. „Wpływ nanocząstek srebra, dwutlenku ceru oraz kropek
kwantowych na wychwyt β -amyloidu przez komórki
mikrogleju”

Choroba Alzheimerera zbiera ogromne żniwo wśród stale starzejącej się populacji w Europie. Badania podstawowe zmierzające do poprawy zrozumienia mechanizmów powstawania i rozwoju choroby, a także jej diagnostyki i leczenia mają dużą wagę. Praca doktorska Pani Katarzyny Sikorskiej należy do tego właśnie nurtu. Dotyczy ona ważnego zagadnienia roli komórek mikrogleju w chorobie Alzheimerera. Celem badań podsumowanych w rozprawie było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy obecność nanocząstek, często stosowanych do diagnostyki i leczenia, a także przenikających do mózgu ze środowiska, zmienia zdolność komórek mikrogleju do wychwytu β -amyloidu. Odpowiedź na to pytanie ma ważne znaczenie szczególnie w kontekście coraz szerszego stosowania nanocząstek w medycynie i życiu codziennym.

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i

Biotechnologii

Zakład Biofizyki

Opis formalny rozprawy

Recenzowana praca ma klasyczny układ i rozpoczyna się od Wstępu, w którym Doktorantka przedstawia rozwój choroby Alzheimerera, rolę i funkcję komórek mikrogleju w mózgu i w chorobie Alzheimerera, czynniki błonowe i białka ważne w jej rozwoju, oraz możliwe zastosowania nanocząstek w chorobie Alzheimerera. Rozdział drugi przedstawia cel pracy, a kolejny wykorzystane Materiały i metody. Następnie Autorka przedstawia uzyskane Wyniki oraz ich Dyskusję na tle literatury światowej, kończąc wyodrębnionym Podsumowaniem. Pracę kończą Wnioski, i streszczenie w języku angielskim, a w ostatnim rozdziale przedstawiono Bibliografię. Całość zawiera się na 102 stronach maszynopisu, a na 76 stronach bez bibliografii, spisu treści i spisu skrótów.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wstęp, mimo iż pozostawia pewien niedosyt, jest dobrze skonstruowany i zawiera wszystkie informacje niezbędne do dalszej lektury. *Cele* są sformułowane zwięźle i klarownie w postaci konkretnych zadań. Obejmują one sprawdzenie toksyczności wybranych nanocząstek (NP) wobec komórek mikrogleju, sprawdzenie czy obecność NP wpływa na wychwyt β -amyloidu (β A), w tym także przy zablokowaniu wybranych receptorów, czy poziom receptorów zmienia się pod wpływem nanocząstek oraz ocenę wpływu NP na aktywację pro-zapalną mikrogleju.

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48(12) 664 60 02

fax +48(12) 664 69 02

email: sekretariat.wbbib@uj.edu.pl

Do badań wybrano 3 nanocząstki, a mianowicie (1) AgNPs jako nanocząstkę o szerokich właściwościach antybakteryjnych i antygrzybiczych; (2) kropki kwantowe o zastosowaniach diagnostycznych oraz (3) dwutlenek ceru o własnościach antyoksydacyjnych, z potencjalnymi zastosowaniami terapeutycznymi. Taki wybór NP z grup o różnych potencjalnych zastosowaniach wydaje się bardzo trafny.

Rozdział *Materiały i Metody* zawiera szczegółowy i precyzyjny opis zastosowanych metod oraz podejść eksperymentalnych. Do realizacji postawionych zadań Autorka użyła szerokiego zestawu narzędzi współczesnej biologii molekularnej, biochemii i mikroskopii. Pani Katarzyna Sikorska okazała się dobrym eksperymentatorem, swobodnie korzystającym z możliwości dostarczonych przez te techniki i sprawnie posługującym się warsztatem analizy statystycznej.

Doktorantka precyzyjnie realizowała postawione sobie cele. Rozpoczęła od charakterystyki nanocząstek, oraz wyznaczenia kinetyki wychwytu β A przez komórki mikrogleju. Następnie wykazała, że lokuje się on w lizosomach.

Zasadnicze wyniki dotyczą wpływu NP na wychwyt β A. Okazało się, że zarówno AgNP, jak i CeO₂NP obniżają zdolność komórek do wychwytu β A. Co więcej, po zablokowaniu receptorów powierzchniowych klasy A, wychwyt ten został całkowicie zablokowany.

W serii doświadczeń nad ekspresją genów stymulowaną NP pokazano, że CdTeQDs stymulują Cd36 i Cd33, przy czym wzrost ekspresji Cd36 został także potwierdzony na poziomie białka. Co ciekawe, AgNP obniżyły poziom receptorów powierzchniowych scara-1, rage i cd36 oraz białka cd33 w komórkach.

Autorka pokazała toksyczność AgNP i CdTeNP wobec komórek mikrogleju, oraz zmiany w cyklu komórkowym pod wpływem wszystkich badanych NP. Badania wydzielania cytokin prozapalnych wykazały, że CeO₂NP prowadzą do podwyższonego poziomu TNF α .

Dyskusja w świetle współczesnej literatury przedstawiona jest ciekawie i wyczerpująco, co świadczy o krytycznym podejściu do otrzymanych wyników. Autorka widzi także że czasami interpretacja wyników jest trudna ze względu na sprzeczne lub niepełne dane literaturowe.

Wnioski zostały sformułowane poprawnie, najpierw w Podsumowaniu, a powtórnie we Wnioskach, tu z wyraźnym podkreśleniem negatywnych skutków działania NP na mikroglej.

Dyskusja merytoryczna przedstawianych metod

Wiele prezentowanych pomiarów opierało się na pomiarach intensywności fluorescencji. W opisie metod często pomijano słowo „intensywność”.

Jak się mają zastosowane stężenia NP do możliwych stężeń NP *in vivo* w mózgu?

str 35 oraz Rys 4: Mimo tego, że słupki błędu na Rys 4 wyglądają rozsądnie, nigdzie nie znalazłam uzasadnienia, dlaczego uśredniano wartości natężenia fluorescencji z 6ciu komórek. Wydaje się to niewielką liczbą.

Zastanawia mnie także, czy stosowane nanocząsteczki wiązały się w pożywce z białkami surowicy oraz z β A? Autorka przedstawia w pracy dane wskazujące na to, że intensywność fluorescencji β A nie ulegała zmniejszeniu (Tab.9), co jednak nie wyklucza możliwości łączenia się NP z białkami i peptydami. Mogłoby to wpływać na transport do wnętrza komórek.

Dyskusja merytoryczna uzyskanych wyników i ich interpretacji

Na stronie 55 Autorka pisze, że chciała sprawdzić, czy istnieją inne drogi transportu β A do komórek mikrogleju niż hamowane receptory. „Rys 11 pokazuje, że żadne z badanych nanocząstek nie zmieniły wychwytu β A po zablokowaniu kwasem poliinozynowym...” Moim zdaniem to zdanie można mylnie rozumieć. Wyniki na Rys 11 pokazują całkowite zahamowanie receptorów i zerowy wychwyty β A. Jeśli wychwyty β A był zerowy, to nic nie było go w stanie już modyfikować (ewentualnie mógłby być zwiększony). Tak więc ściślejszym sformułowaniem byłoby „te wyniki wskazują, że wychwyty β A następuje wyłącznie poprzez hamowane receptory i NP nie wpływają na żaden inny rodzaj jego transportu do wnętrza komórek”.

Na tej samej stronie (s. 55) znajduje się stwierdzenie „wzrost wartości SSC odzwierciedla wychwyty NPs”, które wydaje się, że powinno brzmieć „wzrost wartości SSC odzwierciedla spadek wychwyty NPs.”

Na Rys 9, pokazującym wyniki preinkubacji komórek mikrogleju z NP. przed podaniem β A brak jest danych z preinkubacją z CeO₂NP.

W Dyskusji nie zauważyłam komentarza do obserwowanego wzrostu receptorów scara-1 na powierzchni komórek po inkubacji z kropkami kwantowymi (Rys 14). Oczekiwałabym też podania jakiegoś wyjaśnienia, choćby spekulatywnego, dlaczego CeO₂NP stymulują komórki mikrogleju do produkcji TNF α .

W szerszym kontekście choroby Alzheimera moją ciekawość budzą następujące kwestie, na których poruszenie i przedyskutowanie liczę w czasie obrony:

- Czy jest jakikolwiek związek zapadalności czy rozwoju choroby Alzheimera z chroniczną aktywacją układu immunologicznego np. w różnych infekcjach, czy w otyłości?
- Jak długo żyją komórki mikrogleju w mózgu u człowieka i czy wiadomo, jak zmienia się ich wydajność wychwytywania β A z czasem?

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Praca jest przygotowana bardzo starannie. Zwraca uwagę klarowna struktura, przejrzystość podziału na akapity, rozmieszczenie ilustracji i ich podpisów. Język rozprawy jest jasny, zrozumiały i poprawny. Wyłącznie z obowiązku recenzenckiego zwracam uwagę na drobne błędy edytorskie:

- str 33 Według Słownika Języka Polskiego PWN słowa „sonikować” ani „sonikowano” nie występuje w jęz. polskim (prawidłowo należałoby powiedzieć - dyspergować przy pomocy ultradźwięków)
- str. 37, drugie zdanie :„Następnie traktowano β A ...” powinno chyba być „następnie traktowano komórki β A...”
- str 23 „na modelu mysim” – w modelu mysim, lub u myszy
- Podpisy pod Rys 8 i 9 powinny wyraźniej podkreślać różnice między traktowaniem komórek w przypadku tych dwóch eksperymentów
- w Tabeli 9 i 10 nie podano zastosowanych stężeń nanocząsteczek
- str 65, 67 „szczątek komórkowych” – rzeczownik „szczątki” posiada wyłącznie liczbę mnogą, i w dopełniaczu brzmi „szczątków”

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy ważnej tematyki neurobiologicznej i wnosi nowe informacje do naszego rozumienia funkcjonowania komórek mózgu i wpływu nanocząstek powszechnie obecnych w środowisku na wydajność komórek mikrogleju w usuwaniu β A. Autorka wykazała się wiedzą z zakresu tej tematyki, odpowiednim zastosowaniem metodologii, umiejętnościami analizy i wnioskowania, a przeprowadzając opisane doświadczenia osiągnęła zamierzone cele. Pracę oceniam wysoko, a moje uwagi krytyczne nie umniejszają tej oceny.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Katarzyny Sikorskiej spełnia warunki określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule

naukowym z dnia 14 marca 2003 r z późniejszymi zmianami. Wnoszę
zatem do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego
Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pani mgr
Katarzyny Sikorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcin Elas". The signature is written in a cursive style with a large initial 'M'.

Kraków, 14 września 2019