



Białystok 21. 02. 2021

## Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Anny Lizoń, pt.:

**„Nanocząstki srebra jako narzędzie do badania oddziaływań  
międzybiałkowych”,**

wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Ryszarda Drożdża  
w Zakładzie Diagnostyki Medycznej, Wydziału Farmaceutycznego, Collegium  
Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

W XXI wieku obserwujemy intensywny rozwój różnych gałęzi nanotechnologii, wśród których wyróżnia się nanomedycyna. Nanocząsteczki coraz powszechniej wykorzystywane są do diagnozowania chorób, czy też specyficznego dostarczania środków terapeutycznych. Wydaje się, że nanocząsteczki w znaczącym stopniu przyczynią się do rozwoju medycyny spersonalizowanej.

Nanocząstki metali w specyficzny sposób, zależny od ich budowy i własności fizykochemicznych, oddziałują z różnymi cząsteczkami, a w szczególności z białkami. Tworzenie tak zwanej białkowej korony *in vivo* to niezwykle skomplikowany proces, obejmujący złożoną kinetykę i dynamikę. Warstwa zaadsorbowanych białek na powierzchni nanocząstek może wpływać na zakładany cel zastosowania nanocząstek, a zmiany strukturalne białek, powstałe na skutek połączenia, mogą ograniczać ich funkcje. W warunkach *in vitro* badania oddziaływania pomiędzy białkami z udziałem nanocząstek umożliwiają tworzenie nowych celów diagnostycznych, zwłaszcza dotyczących chorób związanych z tworzeniem i odkładaniem się w tkankach depozytów białkowych.

Zrozumienie zmian konformacyjnych i procesu rozwijania się białek i mechanizmów oddziaływania układu nanocząstka – białka wydaje się bardzo istotne i ważne w aspekcie przyspieszenia biomedycznych zastosowań nanocząstek

w tworzących się nowych dziedzinach współczesnej medycyny, takich jak nanodiagnostyka, nanofarmakologia czy nanoonkologia.

**Podjęcie zatem przez Doktorantkę badań nad nanocząstkami srebra w aspekcie oddziaływań międzybiałkowych uważam za przedsięwzięcie aktualne, ważne i w pełni uzasadnione.**

Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że badania wykonane przez Doktorantkę pochodzą z ośrodka, który ma doświadczenie w badaniach nad nanocząstkami, a publikacje Doktorantki z lat 2018-2019 świadczą, że jest Ona bardzo dobrze przygotowana do tego typu badań.

Doktorantka stworzyła model badawczy, którego warunki umożliwiły próbę zastosowania nanocząstek srebra do oceny oddziaływań międzybiałkowych w oparciu o model antygen – przeciwciało, a także ocenę spontanicznej agregacji wolnych, lekkich łańcuchów immunoglobulin. Doktorantka postanowiła również dokonać oceny użyteczności różnych technik badawczych, stosowanych do badań nad agregacją białek w stworzonym modelu. Kolejnym, ambitnym celem było podjęcie próby opracowania podstaw metody umożliwiającej wykrywanie agregacji wolnych lekkich łańcuchów immunoglobulin.

Oceniana rozprawa obejmuje 97 stron maszynopisu, 33 ryciny oraz 154 pozycje piśmiennictwa. Jest podzielona na typowe rozdziały dla tego typu opracowań, z zachowaniem właściwych proporcji. Rozbudowany spis skrótów, zamieszczony na początku rozprawy, ułatwia wnikliwą analizę pracy.

W bogato ilustrowanym Wstępie Autorka w interesujący sposób przedstawia podstawowe informacje na temat właściwości nanocząstek, możliwości ich potencjalnych modyfikacji i oddziaływań z białkami – z wytworzeniem korony białkowej. W kolejnych podrozdziałach Wstępu przedstawia różne metody syntezy nanocząstek, opisuje zastosowanie nanocząstek srebra zarówno w diagnostyce laboratoryjnej, jak i w terapii. W ostatnim podrozdziale przedstawia opis immunoglobulin, uwzględniając również metody oznaczania lekkich łańcuchów immunoglobulin oraz opisuje związane z nimi problemy metodyczne.

Cel pracy jest krótko i jasno sprecyzowany, z określeniem szczegółowych zadań badawczych.

W rozdziale Materiał i metody badawcze Doktorantka przedstawia sposób syntezy nanocząstek srebra, ocenę ich stabilności, funkcjonalizację za pomocą

komercyjnie dostępnych przeciwciał oraz metodę badań nad oddziaływaniem opłaszczonych na nanocząstkach srebra przeciwciał anty-lambda z komplementarnym antygenem. Materiałem biologicznym wykorzystywanym w pracy były próbki moczu pobrane od 19 pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa.

Do oceny oddziaływań międzybiałkowych Doktorantka wykorzystywała pomiary zmian widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego, metodę obrazowania przy udziale transmisyjnego mikroskopu elektronowego, technikę dynamicznego rozpraszania światła oraz autorską metodę obrazowania, wykorzystującą rozpraszanie światła laserowego. Część badań Doktorantka wykonała w Akademickim Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH w Krakowie. To dodatkowo świadczy, że metodologia pracy uwzględnia współczesne i właściwe metody do realizacji zadania badawczego. Uważam, że znajomość wspomnianych metod, a zwłaszcza interpretacja uzyskanych wyników podkreśla merytoryczną wiedzę i przygotowanie Doktorantki do prowadzenia badań.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedstawiła w sposób w czytelny na 21, często złożonych, rycinach. Obejmują charakterystykę nanocząstek srebra, ocenę stabilności, funkcjonalizację przeciwciałami oraz oddziaływania przeciwciał anty-lambda opłaszczonych na nanocząstkach srebra z komplementarnym antygenem – wolnymi lekkimi łańcuchami lambda. Kolejne ryciny prezentują możliwości wykorzystania nanocząstek srebra do badania procesu wzajemnego oddziaływania wolnych monoklonalnych, lekkich łańcuchów immunoglobulin, pochodzących z próbek moczu od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa.

W obszernej, ilustrowanej dyskusji Doktorantka uzasadnia celowość wykonywanych eksperymentów i konfrontuje wyniki badań własnych z obserwacjami innych autorów. Przedstawia zalety, wady czy ograniczenia stosowanych metod badawczych. Szeroko uzasadnia możliwość zastosowania nanocząstek srebra do badań procesów agregacji lekkich łańcuchów immunoglobulin. Rozdział ten również podkreśla gruntowną wiedzę Doktorantki w zakresie realizowanego tematu.

Sześć wniosków, z których pierwszy jest bardzo ogólny, ale zasadny w kontekście rozprawy oraz streszczenie, również w języku angielskim, podsumowuje rozprawę.

Zestaw cytowanego piśmiennictwa obejmuje właściwe proporcje pomiędzy piśmiennictwem współczesnym a archiwalnym. Zwraca uwagę zdecydowana przewaga publikacji anglojęzycznych.

Oceniana rozprawa jest napisana poprawnym językiem, podczas jej lektury znalazłem nieliczne błędy edytorskie, głównie w piśmiennictwie.

W zasadzie nie mam zastrzeżeń merytorycznych, ale moja bardzo wnikliwa analiza treści rozprawy upoważnia do przedstawienia pewnych sugestii, które mogą być użyteczne w przygotowaniu publikacji do druku:

1. Nie w pełni zgadzam się z częścią treści ostatniego akapitu ze Wstępu rozprawy ze str. 18:

*Nieprawidłowe fałdowanie się białek prowadzić może do wytworzenia zagregowanych form białek (amyloidu) odpowiedzialnego za takie choroby jak: choroba Alzheimerera, Parkinsona, cukrzyca typu II czy AL amyloidoza [37]*

W cukrzycy typu 2 opisany mechanizm odpowiada raczej za powikłania w tej chorobie, a nie jest jej przyczyną.

2. Proponuję ujednoczyć pisownię wszystkich nazw czasopism zawartych w stosownym rozdziale – albo skróty lub pełne nazwy.

3. W kilku miejscach rozprawy Doktorantka opisuje próbki materiału biologicznego np.: .....*charakterystykę moczy*..... strona 38

*W pracy wykorzystano 19 moczy.....* strona 56.

Proponowałbym zamiast terminu *moczy* stosować termin próbki moczu.

4. W rozdziale Wyniki przedstawione są elektroforegramy, a nie odnalazłem opisu metod elektroforez.
5. Nie odnalazłem zgody Komisji Bioetycznej, choć nie jestem przekonany do końca, że taka zgoda do tego typu badań jest konieczna.

Powyższe moje sugestie i uwagi mają jedynie charakter polemiczny, nie podważają merytorycznych założeń rozprawy doktorskiej.

**Reasumując, stwierdzam, iż oceniana praca została zaplanowana, wykonana i napisana poprawnie, świadczy o wiedzy i dociekliwości naukowej Doktorantki. Jest oryginalnym i znaczącym osiągnięciem naukowym, wykazującym charakter aplikacyjny.**

Z powyższych względów uważam, iż, rozprawa doktorska lek. Anny Lizoń pt.: „Nanocząstki srebra jako narzędzie do badania oddziaływań międzybiałkowych” w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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 późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2019r.

**W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem, przedkładam Panu Przewodniczącemu Rady Dyscypliny Nauki o Zdrowiu, Uniwersytetu Jagiellońskiego–Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie wyżej wymienionej do kolejnego etapu przewodu doktorskiego.**

**Ze względu na, moim zdaniem, bardzo wysoki poziom rozprawy zgłaszam wniosek o jej wyróżnienie.**

Uwzględniając przedstawione wytyczne dla recenzentów stwierdzam że:

- praca znacznie przekracza przeciętny poziom rozpraw doktorskich,
- obejmuje niezmiernie ważną i aktualną problematykę badawczą,
- w pracy zastosowano współczesne, zaawansowane metody badawcze,
- praca ma istotne znaczenie poznawcze z elementami aplikacyjnymi,
- dodatkowym argumentem za wyróżnieniem jest opracowanie przez Doktorantkę metody z użyciem lasera zielonego, zastosowanej do oceny oddziaływań międzybiałkowych,
- z baz internetowych wynika, że Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch publikacji z *IF - Materials* 2019 i *Przegląd Lekarski* 2018.
- jest również głównym wykonawcą projektu realizowanego w Zakładzie Diagnostyki Medycznej, co wynika z informacji przedstawionej na stronie internetowej Zakładu.

Powyższe spostrzeżenia uzasadniają wniosek o przyznaniu nagrody.



prof. dr hab. Krzysztof Sobolewski