Puławy, 2014.06.03.

Prof. dr hab. Michał Reichert
Kierownik Zakładu Anatomii Patologicznej
Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy
ul. Partyzantów 57,
24-100 Puławy

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego pt.

„Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych"

wykonanej pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg oraz dr Marty Grodzik – promotora pomocniczego w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt, Wydziału Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie.

Osiągnięcia ostatnich lat określane wspólnym mianem nanotechnologii umożliwiające wytwarzanie na skalę przemysłową nanocząstek o jednolitym kształcie, wielkości i składzie chemicznym nadały nowy impet w wielu dziedzinach nauki w tym w medycynie przyczyniając się do rozwoju nowych metod diagnostycznych oraz terapii chorób nowotworowych. Szczególnie istotnym elementem jest wielkość nanocząstek, która odzwierciedla parametry struktur komórkowych, organelli i biomolekuł znajdujących się wewnątrz żywych komórek organizmu ludzi i zwierząt przez co umożliwia oddziaływanie terapeutyczne na poziomie molekularnym.

Mgr Mateusz Krzysztof Wierzbicki w ocenianej rozprawie doktorskiej podjął ważny z teoretycznego, jak również potencjalnie klinicznego punktu widzenia temat badawczy nad wpływem nanocząstek różnych form alotropowych węgla na rozwój i funkcjonowanie układu krwionośnego na modelu zarodka kury. Celem tych badań było ustalenie czy taki wpływ istnieje, a ponadto poznanie na ile to możliwe mechanizmów rozwoju i funkcjonowania naczyń krwionośnych. Angiogeneza (czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych) jest procesem, który dotyczy każdego żywego organizmu i towarzyszy mu na etapach rozwoju embrionalnego oraz somatycznego jak również jest kluczowym elementem procesu gojenia ran. Zaburzenia procesu angiogenezy z kolei towarzyszą licznym procesom patologicznym i w przypadku takich patologii jak zawał mięśnia sercowego, udar, nefropatie, choroby neurodegeneracyjne wymagają wspomagania (stosowania czynników proangiogennych) natomiast w przypadku chorób nowotworowych, procesów zapalnych, logicznym wydaje się stosowanie terapii antyangiogennej. Doświadczalne zahamowanie procesu angiogenezy skutkuje szybką martwicą nowotworu pozbawionego tlenu i substancji odżywczych dostarczanych normalnie poprzez krew. Stąd też medycyna pokłada duże nadzieje w badaniach nad mechanizmami angiogenezy poszukując możliwości jej kontroli z

hamowaniem procesu włącznie. Dotychczasowe badania mechanizmu tworzenia naczyń krwionośnych doprowadziły do poznania licznych białek funkcjonujących jako czynniki wzrostowe, a także ich receptorów. Stanowią one łącznie potencjalny cel terapii antyangiogennej. Główne grupy czynników aktywnych w procesie angiogenezy to rodzina białek VEGF (vascular endothelial growth factor) - czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego regulujących m.in. homeostazę naczyniową, rodzina czynnika wzrostu fibroblastów – FGF (fibroblast growth factor) odpowiedzialnych głównie za integralność naczyń krwionośnych, białka spokrewnione z płytkopochodnym czynnikiem wzrostu – PDGF (platelet-derived growth factor) regulujące różnicowanie i podziały komórki, kadheryny-białka adhezyjne ułatwiające przyleganie komórek do siebie i tworzenie połączeń pomiędzy pączkującymi naczyniami i inne. Liczne próby terapii antyangiogennej przy pomocy specyficznych przeciwciał bądź skojarzonych z nimi inhibitorów poprzez wpływanie na drogi sygnałowe w których zaangażowane są wymienione powyżej białka proangiogenne nie przyniosły spodziewanych efektów m.in. z uwagi na skutki uboczne, toksyczność itp. Między innymi przeciwciało anty-VEGF w postaci leku o nazwie bevacizumab (Avastin, Genentech) było pierwszym specyfikiem zatwierdzonym przez FDA jako środek antyangiogenny w leczeniu raka okrężnicy.

Niezadowalające wyniki terapii antyangiogennej opartej na próbach wybiórczego oddziaływania na cytokiny proangiogenne powodują, że intensywnie poszukuje się nowych dróg terapeutycznych. W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudza nanobiotechnologia. Jako zalety nanocząstek wymienia się możliwość selektywnego oddziaływania na komórki nowotworowe i relatywnie niską toksyczność w stosunku do całego organizmu. Pośród licznych materiałów takich jak biopolimery, lipidy, polisacharydy czy też metale szlachetne, alotropowe formy węgla w postaci nanocząstek o wymiarach od około 3 do 50 nm stanowią bardzo obiecujący obiekt badań z możliwością potencjalnego wykorzystania w chemioterapii, terapii chorób neurodegeneracyjnych, jako innowacyjne materiały do transportu leków przy wybiórczym niszczeniu komórek nowotworowych czy środków kontrastujących w diagnostyce medycznej. Nanocząstki węgla w postaci nanorurek, nanowłókienek czy też fulerenu cechują się unikalnymi właściwościami jak wysoką reaktywnością w przeliczeniu na jednostkę powierzchni, łatwością chemicznej lub fizycznej koniugacji z biomolekułami, biokompatybilnością, wytrzymałością mechaniczną i prawdopodobnie niewielką toksycznością dlatego są obecnie preferowane w porównaniu do innych grup nanocząstek. Z uwagi na te właściwości można domniemywać, że nanocząstki węgla mogą oddziaływać na szersze spektrum regulatorów angiogenezy w porównaniu do leków stosowanych dotychczas w leczeniu antyangiogennym. Ta hipoteza stała się punktem wyjścia dla szeregu doświadczeń prowadzonych przez mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego wraz ze współpracownikami, których wyniki stały się podstawą pracy doktorskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska nie ma układu klasycznego, natomiast jej integralną część stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, z których dwa posiadają wysoki współczynnik wpływu (IF). Taka forma rozprawy doktorskiej jest dopuszczalna zgodnie z ustawą z dnia z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn.

zm.) zatem może być podstawą ubiegania się kandydata o nadanie stopnia naukowego doktora. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską mają charakter wieloautorski, jednak główny udział mgr Wierzbickiego w realizacji prac, potwierdzony dołączonymi oświadczeniami współautorów, nie budzi wątpliwości. Prace stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane w latach 2012 – 2013 i są to:

Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Prasek M, Jaworski S, Chwalibog A. Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles. Nanoscale research letters 2013, 8, 195.

Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M. Caveolin-1 localization in chicken embryo chorioallantoic membrane treated with diamond and graphite nanoparticles. Annals of Warsaw University of Life Sciences – SGGW 2012, 51, 133-138.

Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M, Hotowy A, Prasek M, Jaworski S, Sawosz F, Chwalibog A. Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis. International Journal of Nanomedicine 2013, 8, 3427-35

Współczynnik wpływu (IF) dwóch z tych czasopism tj. Nanoscale Research Letters oraz International Journal of Nanomedicine w roku 2012 wyniósł odpowiednio 2,5 oraz 3,5, zaś sumaryczna punktacja załączonych prac wynosi 6,0. Punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zawarta jest między 2 a 35 punktów, w sumie 72.

Przytoczone wskaźniki pośrednio wskazują na walory i wysoki poziom merytoryczny publikacji stanowiących pracę. Należy przy tym pamiętać, że każda z publikacji włączonych do pracy doktorskiej, zanim ukazała się w druku musiała uzyskać pozytywne opinie ekspertów w danej dziedzinie, a zatem obecna recenzja pracy doktorskiej napisanej w takiej formule skupia się na merytorycznej ocenie całokształtu badań ujętych w załączonym cyklu prac oraz osobistego wkładu Doktoranta w ich powstanie.

Z załączonych do rozprawy doktorskiej oświadczeń wynika, że wkład pracy większości współautorów w liczbie od 2 do 7 w zależności od publikacji polegał na cząstkowym udziale w stosowanych procedurach badawczych jak np. pomocy w przygotowaniu zawiesin nanomateriałów, preparatów nanocząstek, implantów bibułowych i żelatynowych, pomocy w przeprowadzaniu oznaczeń biochemicznych, projektowaniu starterów do reakcji RT-PCR oraz obsłudze mikroskopu konfokalnego. W przypadku jednego z autorów również pomoc w przygotowaniu publikacji do druku. Z kolei z oświadczenia promotora pracy, pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg wynika, że pomoc ta miała charakter głównie merytoryczny (należy domniemywać, że również koncepcyjny) nad prowadzonymi doświadczeniami co jest powszechnie akceptowane jako właściwa rola promotora, a także polegała na pomocy w przygotowaniu i złożeniu publikacji do druku. W załączonych oświadczeniach brakuje procentowego określenia udziału poszczególnych współautorów w publikacjach natomiast mają one charakter opisowy. Współautorzy określają swój udział wyłącznie jako pomoc przy wykonaniu niektórych zadań. Zatem biorąc to pod uwagę, jak również fakt, że autor dysertacji doktorskiej jest w załączonych publikacjach na pierwszym

miejscu jest oczywiste, że jego wkład na każdym etapie realizacji cyklu załączonych publikacji miał charakter dominujący.

W związku z faktem, że zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią trzy spójne tematycznie publikacje naukowe tym samym klasyczny układ pracy obejmujący wstęp, hipotezę i cel pracy, metodykę, wyniki, wnioski oraz bibliografię (w sumie 23 strony tekstu) został przedstawiony bardzo syntetycznie i ma na celu przede wszystkim wprowadzenie do istoty problematyki szczegółowo przedstawionej w załączonych publikacjach, a także streszczenie istotnych elementów wymienionych rozdziałów, zwrócenie uwagi na osiągnięcia będące rezultatem przeprowadzonych doświadczeń oraz wnioski z nich wypływające. Pierwsza (klasyczna) część rozprawy doktorskiej stanowi zatem element łączący bez którego trudno byłoby w pełni ocenić całokształt przeprowadzonych doświadczeń jako logiczny ciąg zadań badawczych realizowanych z zamiarem empirycznego potwierdzenia bądź zaprzeczenia słuszności postawionych wcześniej hipotez.

W rozdziale 1. „Wstęp" Autor w syntetyczny sposób scharakteryzował proces angiogenezy podkreślając rolę kluczowych cytokin i regulatorów tego procesu. W dalszej części omówił sytuację związaną z problemami terapii niekontrolowanej angiogenezy oraz mechanizmy oddziaływania niektórych dostępnych leków antyangiogennych jak również zwięźle uzasadnił powody dla których wzrasta ostatnio zainteresowanie nanocząstkami, w tym nanocząstkami węgla jako potencjalnymi biomateriałami przydatnymi w terapii antyangiogennej. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości problematyki związanej z obszarem podjętych badań. Również przywołane piśmiennictwo jest jak najbardziej aktualne i dobrze uzasadnia cel pracy. Syntetyczny charakter wstępu jest w pełni uzasadniony, gdyż druga część pracy doktorskiej składa się z kompletnych publikacji naukowych, z których każda zawiera własne uzasadnienie konkretnego zadania wraz z odwołaniem się do szeroko przytaczanej literatury z danego obszaru badawczego. Dlatego też wstęp do pracy doktorskiej ma na celu jedynie ogólne wprowadzenie do tematyki badawczej i połączenie poszczególnych zagadnień, które zostały następnie zrealizowane jako kolejne doświadczenia, w jedną całość. Pomimo syntetycznego z założenia podejścia Autorowi udało się przybliżyć w sposób wyczerpujący najważniejsze fakty z obszaru badań naukowych obejmujących tematykę pracy i uzasadniających przyjętą następnie hipotezę badawczą i cel pracy.

Hipoteza badawcza (rozdział 2.) zakładająca, że nanocząstki różnych form alotropowych węgla indukują mechanizmy zaburzające rozwój i funkcje naczyń krwionośnych miała moim zdaniem wystarczające oparcie w nielicznych danych literaturowych. Jak następnie udowodniono w toku realizacji pracy niektóre nanocząstki węgla rzeczywiście hamują rozwój naczyń krwionośnych nie wykazując przy tym działania toksycznego. Również cel pracy został przejrzyście określony a jego realizacja została zaplanowana w postaci trzech logicznie ułożonych zadań, których kolejna realizacja stanowiła podstawę dla kolejnego zadania.

Rozdział 3. „Metodyka badań" jest podzielony na cztery podrozdziały w których scharakteryzowano zastosowane nanocząstki, układ doświadczeń, metody analityczne oraz testy statystyczne. Syntetyczny układ sprawia, że rozdział ten jest bardzo czytelny i klarowny i nie zawiera nadmiaru niepotrzebnych szczegółów. Takie przedstawienie

metodologii mogłoby być powodem do zastrzeżeń w klasycznym układzie pracy doktorskiej, natomiast w obecnej formule jest jak najbardziej prawidłowe, gdyż szczegóły metodyczne nie ujęte w tej części można znaleźć w stosownych rozdziałach załączonych publikacji. Rozdział rozpoczyna omówienie różnych form alotropowych nanocząstek węgla stosowanych w pracy natomiast ich szczegółowa charakterystyka fizyczna znalazła się w tabeli co niewątpliwie zwiększa przejrzystość tej charakterystyki, a w przyszłości umożliwi zainteresowanym badaczom szybkie odtworzenie warunków doświadczenia i ewentualne porównanie wyników. Również rozdział opisujący układ doświadczeń str. 17 – 20 jest napisany przejrzyście a załączona ryc. 1. dodatkowo ułatwia zrozumienie intencji i zamierzeń Autora jeśli chodzi o przesłanki kolejnych doświadczeń, których było w sumie cztery.

Podrozdział 3.3. „Metody analityczne" zawiera wykaz wykorzystanych przy realizacji pracy metod badawczych. Metody są nowoczesne i właściwie dobrane natomiast nie umożliwiają wglądu w szczegółowy protokół czynności laboratoryjnych. Zgodnie z formułą dysertacji, tak jak to już zostało powiedziane nie ma potrzeby podawania nadmiaru szczegółów w tym miejscu pod warunkiem, że czytelnik może je znaleźć w odpowiednim miejscu załączonych publikacji. Generalnie ten warunek jest spełniony zdarza się jednak, że czytając pracę napotyka się na fragmenty opisu metod nie do końca klarowne. Tak jest w przypadku opisu metody analizy morfologii i rozwoju naczyń krwionośnych CAM, oznaczania długości naczyń i dalszej charakterystyki co zostało zgodnie z formułą przyjętą w pracy tylko hasłowo potraktowane w spisie metod (p. 3.3, str. 20) natomiast w opisie układu doświadczeń można znaleźć więcej informacji ale wątpliwości budzi 2-krotnie użyte sformułowanie cyt. „ naczynia krwionośne oraz komórki mezenchymalne znajdujące się na implancie były obserwowane pod mikroskopem konfokalnym…". Można by na tej podstawie błędnie wnioskować, że naczynia wrastały w bibułę tworzącą implant i, że to implanty po zdjęciu z CAM były oglądane pod mikroskopem. Tym bardziej, że w szczegółowym opisie metody „CAM assay" w pracy „Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles" włączonej do dysertacji mylące może być stwierdzenie, że po utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie implanty były oddzielane of CAM. Dlatego, aby uniknąć niejasności w odbiorze przez czytelnika nie stosującego tej metody prawidłowo powinno być „naczynia krwionośne CAM znajdujące się pod implantem".

Należy domniemywać, że z uwagi na formułę dysertacji autor świadomie zrezygnował z osobnego rozdziału i wyniki badań łącznie z dyskusją i umieścił w rozdziale 4. „Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych". Uzyskane wyniki zgodnie z zakresem badań wyszczególnionym w rozdziale 2. na str. 15 potwierdziły hipotezę badawczą jak również antyangiogenny wpływ nanocząstek diamentu, grafitu oraz nanorurek wielościennych. Autor wykazał jednocześnie brak takiego wpływu w przypadku nanocząstek grafenu i stymulujący wzrost naczyń wpływ fulerenu C60. Ponadto wykazał brak toksycznego wpływu nanocząstek diamentu i grafitu na rozwój zarodka kury. Wśród celów jakie postawił sobie Autor realizując pracę doktorską było wskazanie potencjalnych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw oddziaływania nanocząstek węgla na proces angiogenezy. Biorąc pod uwagę fakt, że proces tworzenia nowych naczyń jest niezwykle skomplikowany i bierze w nim udział wiele różnych białek Autor stanął przed ambitnym ale jednocześnie z

konieczności trudnym zadaniem skoncentrowania się na nielicznych spośród nich. Jako główne cele molekularne Autor wskazał VEGFA oraz bFGF. Wybór tych białek jako kluczowych regulatorów procesu angiogenezy jest moim zdaniem słuszny i potwierdza dobre rozeznanie Autora w tym obszarze badań. VEGF oraz FGF znajdują się w centrum dróg sygnałowych i odpowiadają m.i. za proces homeostazy naczyniowej, zmiany fenotypu komórek śródbłonka na bardziej inwazyjny oraz za integralność naczyń (FGF). Intuicja badawcza nie zawiodła Autora i udało się wykazać, że obydwie formy alotropowe węgla (ND i NG) hamują rozwój naczyń krwionośnych przy pomocy mechanizmu, w którym uczestniczy białko FGF. Wynik ten jest wiarygodny, gdyż został potwierdzony zarówno na poziomie RNA (zmniejszenie ilości transkryptów) jak i na poziomie białka przy pomocy odpowiednich metod (RT-PCR, Western blot i ELISA). Wykazanie przez Autora hamującego angiogenezę wpływu nanocząstek węgla za pośrednictwem FGF otwiera drogę do badań klinicznych przy udziale inhibitorów tego białka zwłaszcza, że duże nadzieje pokładane w terapii wykorzystującej inny kluczowy regulator – VEGF często zawodzą. Uzyskane przez Autora wyniki są wartościowe tym bardziej, że piśmiennictwo dotyczące wykorzystania nanocząstek węgla w regulacji angiogenezy jest raczej nieliczne. Na szczególną uwagę zasługują wyniki badania wpływu niefunkcjonalizowanych nanocząstek diamentu i grafenu płatkowego na rozwój naczyń krwionośnych uzyskane przez Autora, które moim zdaniem można uznać za unikalne w skali światowej.

Bibliografia jest kompletna co było niejako ułatwione z uwagi na nieliczne badania nad wpływem nanocząstek węgla na angiogenezę. Jest to jednocześnie, jak już zaznaczałem, duży plus jeśli chodzi o inwencję Autora (oraz całego Zespołu, z którym współpracuje), gdyż badania te wypełniają autentyczną niszę w wiedzy. Na marginesie, nie umniejszając pozytywnej oceny dobrze dobranej literatury warto zauważyć, że należałoby staranniej przygotowywać listę piśmiennictwa, gdyż w tekście są cytowane prace, których w spisie nie ma np. Grodzik i wsp., 2011 - str 23.

Ogólna ocena pracy

Na szczególne podkreślenie zasługuje pionierski charakter badań podjętych przez mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego i współautorów, gdyż piśmiennictwo dotyczące wpływu różnych form alotropowych niefunkcjonalizowanych (dziewiczych) nanocząstek węgla na proces angiogenezy jest bardzo nieliczne. W anglojęzycznym piśmiennictwie znaleziono jedynie 2 prace eksperymentalne dotyczące wpływu wybranych form alotropowych nanocząstek węgla na proces angiogenezy (prace cytowane zresztą przez Doktoranta). Jedna z tych prac (Meng H i wsp. z 2010 r) dotyczy właściwości nanocząstek pochodnej fulerenu (fulerenu w połączeniu z gadolinem) natomiast druga praca (Murugesan S i wsp., 2007) tematycznie jest bardziej zbliżona do pracy mgr Wierzbickiego i dotyczy wpływu trzech różnych form alotropowych niefunkcjonalizowanych nanocząstek węgla tj. nanorurek, fulerenu i grafitu na proces angiogenezy. Poza tymi dwoma pracami nie istnieją żadne inne publikacje dostępne w bazie PubMed, które dotyczyłyby tego problemu. W tym kontekście wartym podkreślenia jest znacznie szerszy zakres badań jakich podjął się Doktorant, a mianowicie poszerzył repertuar alotropowych form węgla o nanocząstki diamentu i

grafen płatkowy co do których właściwości antyangiogennych brak jest jakichkolwiek danych. Ponadto przeprowadził badania toksyczności uwzględniając cały zarodek kury ze szczególnym zwróceniem uwagi na mięsień sercowy. Chciałbym również podkreślić właściwy, oparty na dobrej znajomości piśmiennictwa, wybór rodzaju nanocząstek stosowanych w doświadczeniach tj. różnych form alotropowych węgla, które, za wyjątkiem nanocząstek grafitu, charakteryzują się ujemnym potencjałem zeta kojarzonym jak wiadomo ze słabą zdolnością uszkadzania błon komórkowych, a przez to niewielką cytotoksycznością. Kwestią otwartą jeśli chodzi o cytotoksyczność jest praktyczne zastosowanie nonocząstek węgla w biomedycynie, gdyż ostateczna cytotoksyczność zależy od specyfiki modyfikacji chemicznych tych nanocząstek w procesie funkcjonalizacji co będzie wymagać dalszych badań.

Praca mgr Wierzbickiego ma wszelkie cechy pracy nowatorskiej, gdyż została wykonana przy użyciu właściwie dobranych i nowoczesnych metod badawczych, a sam temat pomimo lawinowego w ostatnich latach wzrostu liczby publikacji z dziedziny nanotechnologii stanowi bez wątpienia niszę, której eksploracja w przyszłości może zaowocować przełożeniem na skuteczną terapię antyangiogenną. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie metody badania wpływu biomateriałów na rozwój naczyń krwionośnych na modelu błony kosmówkowo-omoczniowej (CAM) zarodków kurzych. Metoda wykorzystująca technikę implantów na błonie CAM (*in-ovo*) była i jest nadal szeroko stosowana w badaniach związanych z angiogenezą pomimo pewnych niedoskonałości takich jak ryzyko niespecyficznych reakcji zapalnych wywoływanych przez implant i związanej z tym proliferacji naczyń, problemy z odróżnieniem procesu tworzenia nowych naczyń od zwykłego ich rozszerzenia jako reakcji na bodźce związane z umieszczeniem implantu itp. Uważa się, że tych niedoskonałości można uniknąć stosując modyfikację metody polegającą na użyciu zarodków kurzych inkubowanych *ex-ovo* i oferujących możliwość bezpośredniego liczenia i obrazowania *in situ* naczyń krwionośnych wrastających wertykalnie w stosunku do pierwotnie istniejącej siatki naczyń w skupiska bydlęcego kolagenu (vitrogen) nakładanego na CAM. Ta modyfikacja umożliwia nie budzące wątpliwości odróżnienie nowych naczyń (będących rezultatem eksperymentu) od już istniejących. Ponieważ jednak w ocenianej pracy Doktorant wykazał hamowanie wzrostu naczyń krwionośnych przez nanocząstki diamentu oraz nanorurki wielościenne tym samym niedoskonałości związane z ryzykiem reakcji niespecyficznych o charakterze proliferacji zostały ograniczone (może za wyjątkiem badania fulerenu C60) do minimum. Potwierdza to dobre rozeznanie Doktoranta, jeśli chodzi o istniejące metody i właściwie dokonany wybór. Godnym podkreślenia jest również wybór tematu, gdyż wypełnia on w ten sposób lukę w piśmiennictwie i dostarcza nowych danych eksperymentalnych jeśli chodzi o kontrolę patologicznej angiogenezy. Słowa uznania należą się także promotorom pracy za wybór tematyki, która jest doceniana przez środowisko naukowe czego dowodem są znakomite publikacje m.in. obecnie oceniane w ramach pracy doktorskiej mgr. Wierzbickiego.

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim bazującym na wynikach szeroko prowadzonych prac

eksperymentalnych. Forma i treść pracy jest przejrzysta i w sposób logiczny i dobrze udokumentowany prowadzi do konstruktywnych wniosków podsumowujących wartościowe wyniki. Tym niemniej z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na nieliczne nieścisłości i uchybienia:

Na początek drobna uwaga głównie natury stylistycznej dotycząca celu pracy. Liczę na dyskusję w tej sprawie, ale moim zdaniem cel sformułowany przez Autora nie jest zbyt klarowny. Uważam, że lepiej brzmiałoby:

Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych nanocząstek węgla na rozwój oraz mechanizmy kontrolujące funkcjonowanie układu krwionośnego na modelu zarodka kury.

Mam pewne zastrzeżenia do omówienia wyników w punkcie 4.2 „Wpływ nanocząstek grafitu i diamentu na rozwój zarodka kury". Już w trzecim zdaniu Autor pisze: W przeprowadzonym doświadczeniu nie zaobserwowano negatywnego wpływu na rozwój oraz morfologię zarodka kury w 19 dniu rozwoju. Jednocześnie pod koniec rozdziału 4.2 Autor pisze, że nanocząstki diamentu (ND) oraz nanocząstki grafitu (NG) hamowały rozwój naczyń CAM oraz naczyń serca. Również w załączonej publikacji stanowiącej część pracy doktorskiej w rozdziale „Conclusion" Autorzy podkreślają, że gęstość unaczynienia serca ulegała znacznej redukcji pod wpływem ND oraz GR. Dlatego też stwierdzenie o braku negatywnego wpływu na morfologię zarodka jest nieuprawnione, gdyż unaczynienie serca jest elementem morfologii. Prawdziwe zatem byłoby stwierdzenie o braku zmian anatomopatologicznych lub zmian makroskopowych zarodka w 19 dniu rozwoju. Tym bardziej, że nie badano mikroskopowo innych narządów wewnętrznych.

Na końcu rozdziału 4.2. Autor konkluduje, że ND oraz NG pomimo aktywności antyangiogennej nie wykazują toksyczności w stosunku do zarodka kury opierając się badaniu śmiertelności oraz wskaźników biochemicznych tychże zarodków. Takie stwierdzenie może sugerować, że badane nanocząstki są całkowicie bezpieczne i mogą być stosowane nie tylko doświadczalnie, ale również w zastosowaniach terapeutycznych. O ile rzeczywiście wyniki konkretnych doświadczeń przeprowadzonych przez Autora uprawniają do takiej konkluzji to jednak nie znamy długofalowych konsekwencji stosowania nanocząstek węgla po 19 dniu rozwoju zarodkowego (toksyczność zależy nie tylko od dawki ale i od czasu). Moim zdaniem przydałaby się szersza dyskusja w tym miejscu również w oparciu o dane z piśmiennictwa chociażby dlatego, że ten rozdział z definicji jest przeznaczony na „omówienie wyników". Podkreślam, ze powyższa uwaga nie kwestionuje wartościowych wyników uzyskanych przez Autora, a jedynie ma na celu zwrócenie uwagi na zbyt oszczędne omówienie niewątpliwie interesujących wyników w tym miejscu.

Przechodząc do rozdziału „Wnioski" uważam, że wniosek nr 4 (str. 26) jest niekompletny tj. brakuje odniesienia do ciekawych wyników badania rozmieszczenia

kaweoliny-1 w komórkach CAM przeprowadzonych w doświadczeniu II. Autorzy wykazali bowiem, że nanocząstki diamentu zmieniają dystrybucję kaweoliny-1 wewnątrz komórki. Kaweolina-1 jest ważnym, wielofunkcyjnym białkiem zaangażowanym w szlakach sygnałowych wielu rodzajów komórek, w tym również kaskady Ras-p42/44 MAPK, a także szlaków związanych z angiogenezą, którego gen posiada cechy supresora nowotworów. Szkoda również, że w doświadczeniu II oprócz nanocząstek diamentu i grafitu nie zbadano również wpływu nanorurek wielościennych na CAM i dystrybucję kaveoliny-1, co byłoby logicznym rozwinięciem wyników uzyskanych w doświadczeniu I.

Z innych drobnych niedociągnięć już wspomniano o niekiedy niejasnym opisie metodologii badań co jest ważne szczególnie dla czytelnika pracy nie mającego doświadczenia z konkretną metodą. Wspomniane powyżej uchybienia są nieliczne i wynikają zapewne z pośpiechu czy też roztargnienia Doktoranta. Nie umniejszają również wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Autor włożył ogromny wkład pracy i w pełni zrealizował zakładane cele. Uzyskane wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze jak i potencjalnie aplikacyjne.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego odpowiada warunkom stawianym na stopień doktora nauk w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, art. 13 ust. 2 i 4 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i mam zaszczyt przedstawić Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
ZAKŁADU ANATOMII PATOLOGICZNEJ

prof. dr hab. Michał Reichert
Profesor zwyczajny