Prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak
Katedra Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

OCENA
pracy doktorskiej mgr Mateusza Krzysztofa Wierzbickiego

wykonanej w Katedrze Żywienia i Biotechnologii Zwierząt,
Wydziału Nauk o Zwierzętach,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
pod kierunkiem pani prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg

nt.

Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach,
SGGW w Warszawie (pismo Pani Dziekan z dnia 21.03.2014 roku)
zgodnie z wymaganiami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku *„O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki"*
(Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami)

1. Pan mgr Mateusz Wierzbicki, jako oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, w rozumieniu art. 13 ust. 1 i 2 ustawy, z dnia 14 marca 2003 roku *„O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki"* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) przedłożył rozprawę doktorską zatytułowaną: *Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych*. Praca ta stanowi spójny tematycznie zbiór trzech opublikowanych, oryginalnych prac naukowych:

- 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. (35 pkt, IF 2,524)
- 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 (2 pkt),
- 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 (35 pkt, IF 3,463).

Łączny IF tych prac wynosi $5{,}987_{[2012]}$, a suma punktów wg wykazu MNiSW wynosi $72_{[2013]}$. Współautorzy wszystkich ww. prac zgodnie oświadczyli, że udział Pana mgr. Mateusza Wierzbickiego w tych pracach był „wiodący i pierwszoplanowy" oraz, że stanowią one Jego osiągnięcie.

2. Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. W części pierwszej *(Wstęp)* Autor, w skrótowej wersji, przedstawił proces angiogenezy i scharakteryzował główne czynniki proangiogenne oraz uzasadnił celowość prowadzenia badań nad rolą nanocząstek w tych procesach. Następnie przedstawił, wspólną dla prezentowanego cyklu prac, hipotezę badawczą, sformułował cel badań i podał ich zakres metodyczny.

Założonym celem tego cyklu badań było: (i) zbadanie i ocena wpływu pięciu rodzajów nanocząstek węgla na hamowanie angiogenezy w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury; (ii) określenie potencjalnej toksyczności wybranych nanocząstek węgla, na podstawie oceny występowania zmian/zaburzeń rozwojowych i śmiertelności w okresie zarodkowym; (iii) zbadanie i ocena wpływu wybranych nanocząstek węgla na morfologię serca zarodka kury oraz rozwój naczyń krwionośnych serca. Tak sformułowany cel jest jasny i jednoznaczny. W świetle dotychczasowego stanu wiedzy jest bardzo ważny i uzasadniony. Istotnym jest, że przyczyn zmian morfologicznych i funkcjonalnych, autor poszukiwał również na poziomie molekularnym.

W kolejnym rozdziale *(Metodyka badań)* Autor przedstawił układ czterech doświadczeń, które stanowiły podstawę publikacji „doktorskich", podał ich cel i główne założenia metodyczne, scharakteryzował także wykorzystane w doświadczeniach nanocząsteczki węgla i opisał stosowane metody analityczne i statystyczne. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie w badaniach innowacyjnej aparatury i technicznie zaawansowanych urządzeń, a także wysokospecjalistycznych metod analitycznych i aplikacji bioinformatycznych.

W rozdziale *„Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych"* autor odniósł się do wpływu badanych nanocząstek węgla (diamentu, grafitu, grafenu, fulerenu i nanorurek węglowych) na rozwój naczyń krwionośnych. Nastepnie dokonał analizy wyników uzyskanych w badaniu wpływu wybranych nanocząstek (grafitu i diamentu) na rozwój zarodka kury. W ostatniej części rozdziału przedstawił wyniki badań i własne supozycje dotyczące mechanizmu antyangiogennego działania nanocząstek.

Część pierwszą pracy kończy podsumowanie uzyskanych wyników w formie wniosków, które mają uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach. Ta część pracy zawiera także wykaz piśmiennictwa (38 pozycji), dotyczącego przedmiotowych zagadnień, streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy.

3. Część druga pracy zawiera kserokopie ww. oryginalnych prac twórczych, będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej.

3.1. Pierwsza praca pt. *Comparison of anti-angiogenic properties of pristine carbon nanoparticles* (autorstwa: Wierzbicki M., Sawosz E., Grodzik M., Prasek M., Jaworski S., Chwalibog A.) dotyczy badania i oceny wpływu nanocząstek diamentu i grafitu, płatków grafenu, nanorurek węglowych oraz fulerenów C60, na rozwój naczyń krwionośnych. Autor założył hipotezę, że nanocząstki węglowe mogą wywierać, poprzez receptory VEGF i bFGF, hamujący wpływ na angiogenezę w guzie nowotworowym. W związku z różnymi właściwościami poszczególnych nanostruktur węglowych postanowił zbadać skuteczność działania antyangiogennego pięciu z nich, i dokonać wyboru tych, które wykażą się najwyższą skutecznością/przydatnością w terapii antynowotworowej.

Materiał badawczy stanowiło 120 zarodków kur, linii Ross 308. Zapłodnione jaja utrzymywano w ciągu 4 dni w temperaturze 12°C, a następnie sterylizowano światłem ultrafioletowym i podzielono na sześć grup: pięć grup badawczych (odpowiadających poszczególnym odmianom nanocząstek węglowych; $n_{[gr]}=20$) oraz grupę kontrolną (n=20). Jaja inkubowano w standardowych warunkach (temperatura 37°C, wilgotność 60%, obracanie raz na godzinę). Właściwe badania wykonano na błonach kosmówkowo-omoczniowych zarodków, na które w szóstym dniu rozwoju zarodkowego, nakładano implanty wykonane ze sterylnej bibuły filtracyjnej o średnicy 10 mm, na które nanoszono: 20 µl wody (grupa kontrolna) lub hydrokoloidu nanocząstek o stężeniu 500 µg /ml (ostateczna ilość nanocząstek na implancie wynosiła 0,01 mg).

W siódmym dniu rozwoju zarodków, po odpowiednim przygotowaniu implantów z CAM, prowadzono obserwację i fotografowanie naczyń krwionośnych oraz pobierano materiał do dalszych analiz. Angiogenezę, w ośmiu próbach z każdej grupy, określano przez obliczenie powierzchni naczyń, ich długość i ilość punktów rozgałęzień, w trzech, wybranych losowo, kwadratach o wymiarach 2,5 x 2,5 mm (powierzchnia 18,75 mm^2). Analizowano naczynia o średnicy mniejszej niż 100 µm, oraz o średnicy pomiędzy 100-200 µm. Naczyń o średnicy większej niż 200 mikrometrów nie oceniano. Do analizy wykorzystano aplikację CellSens Dimension Desktop v. 1.3 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Prowadzono również obserwację naczyń włosowatych (w mikroskopie stereoskopowym) oraz analizy skrawków tkanek (w mikroskopie świetlnym).

Ponadto przeprowadzono analizę Western blot dwóch białek błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kury, tj. receptora czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR) oraz receptora czynnika śródbłonka naczyń krwionośnych (KDR). Po przygotowaniu materiału do blottingu, białka rozdzielano metodą elektroforezy 1-D, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), przenoszono na błonę PVDF i inkubowano ze swoistymi przeciwciałami. Do wizualizacji wykorzystano metodę fluorescencji. Charakterystykę białek przeprowadzono z wykorzystaniem aplikacji bioinformatycznej Quantity One.

Do istotnych wyników tych badań zaliczam wykazanie, że:

- nanocząstki węgla mogą wywierać działanie zarówno antyangiogenne (np. diament), jak i proangiogenne (np. fuleren C60); niektóre z nich nie wykazują istotnego wpływu na ten proces (np. nanorurki węglowe),
- antyangiogenny wpływ nanocząstek przejawia się zmianami morfologicznymi naczyń krwionośnych (np. diament powodował zmniejszenie światła naczyń),
- efekty te związane są ze zmianami poziomu ekspresji białek, np. diament (jako jedyny z pośród badanych nanocząstek węgla) obniżał ekspresję receptora czynnika śródbłonka naczyń krwionośnych (KDR), głównej cytokiny inicjującej angiogenezę (nie wykazywał natomiast wpływu na receptor czynnika bFGF).

3.2. Druga praca pt. *Caveolin-1 localization in chicken embryo chorioallantoic membrane treated with diamond and graphite nanoparticles* (autorstwa: Wierzbicki M, Sawosz E, Grodzik M.), dotyczy

badania i oceny wpływu nanocząstek diamentu i grafitu na rozwój komórek mezenchymalnych błony kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurzego, z uwzględnieniem wewnątrzkomórkowej lokalizacji kaweoliny-1.

Białka należące do rodziny kaweolin są głównymi składnikami mikrodomen błon komórkowych (kaweoli). Są m.in. odpowiedzialne za transport (endocytozę), ale również za wewnątrzkomórkowy przekaz informacji. Z piśmiennictwa wiadomo, że zmiany ekspresji tych białek występują zarówno w tworzeniu guza jak i progresji nowotworu. Kaweolina-1 obniża ekspresję głównego czynnika proangiogennego VEGF, a także białek: AKT i Stat3, istotnych ogniw w kaskadzie sygnalizacyjnej, ważnych w rozwoju naczyń krwionośnych.

Autor, w innych, współautorskich badaniach stwierdził, że nanocząstki diamentu obniżają poziom mRNA dla VEGF oraz FGF2, co w efekcie prowadzi do obniżenia gęstości sieci naczyń krwionośnych w glejaku. Dlatego założył hipotezę, że molekularny mechanizm działania nanocząsteczek diamentu może być związany z ich interakcją ze składnikami błony komórkowej, a współdziałanie z komórkową pulą kaweoliny-1, obniża sprawność angiogennych szlaków sygnalizacyjnych.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na materiale zwierzęcym i według procedur doświadczalnych, identycznych jak w doświadczeniu opisanym w punkcie 3.1. Łącznie wykorzystano 45 zarodków kur linii Ross 308, podzielonych na trzy grupy (n=15), dwie grupy doświadczalne i jedną kontrolną.

W siódmym dniu rozwoju zarodków, po odpowiednim przygotowaniu implantów z błony kosmówkowo-omoczniowej, prowadzono obserwację naczyń krwionośnych oraz komórek mezenchymalnych, w mikroskopie konfokalnym. Analizowano liczbę komórek mezenchymalnych na powierzchni 1 mm^2 błony kosmówkowo-omoczniowej w grupach doświadczalnych, w porównaniu do grupy kontrolnej oraz badano rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe kaweoliny-1.

Do istotnych wyników tych badań zaliczam wykazanie, że:

- nanocząstki diamentu istotnie zmniejszały gęstość komórek mezenchymalnych i włókien kolagenu macierzy zewnątrzkomórkowej,
- nanocząstki grafitu nie wywierały istotnego wpływu na gęstość komórek mezenchymalnych,
- ekspresja kaweoliny-1 zachodziła w komórkach mezenchymy, śródbłonka naczyń krwionośnych i błony kosmówkowej, we wszystkich grupach (z nanocząstkami diamentu i grafitu oraz w grupie kontrolnej),
- rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe kaweoliny-1 jest odmienne w zależności od działającego „bodźca". W grupie traktowanej nanocząstkami diamentu była ona rozmieszczona równomiernie wewnątrz komórek, a w pozostałych grupach była zlokalizowana głównie przy częściach bocznych błony komórkowej.

Wyniki uzyskane w badaniach upoważniają autora do stwierdzenia, że kaweolina-1 i nanocząstki diamentu współdziałają ze sobą, w procesie hamowania angiogenezy.

3.3. Trzecia praca pt. *Carbon nanoparticles downregulate expression of basic fibroblast growth factor in the heart during embryogenesis.* (autorstwa: Wierzbicki M., Sawosz E., Grodzik M., Hotowy A., Prasek M., Jaworski S., Sawosz F., Chwalibog A.), dotyczy badania i oceny wpływu nanocząsteczek diamentu i grafitu na rozwój naczyń krwionośnych błony kosmówkowo-omoczniowej, a także na rozwój zarodka kury, w tym rozwój naczyń krwionośnych serca. Ponadto celem badań było określenie ich wpływu na najważniejsze czynniki proangiogenne oraz zbadanie potencjalnej toksyczności badanych nanocząstek.

Doświadczenie zostało przeprowadzone w dwóch etapach. W pierwszym badano angiogenezę według procedur opisanych w pierwszej pracy (pkt. 3.1.) z tym, że implanty zawierające badane nanocząstki zostały nałożone na błonę kosmówkowo-omoczniową w 8 dniu życia zarodkowego kurcząt, a mikroskopowa analiza rozwoju naczyń krwionośnych (długości i ilości rozgałęzień) była prowadzona w 11 dniu rozwoju. W tym etapie wykorzystano 90 zarodków kurcząt linii Ross 308 (po 30 zarodków w grupie).

Wyniki badań potwierdziły działanie antyangiogenne nanocząstek diamentu, a przedłużenie czasu inkubacji pozwoliło zaobserwować hamowanie angiogenezy także przez nanocząstki grafitu.

W drugim etapie, badania przeprowadzono na 120 zarodkach, podzielonych na osiem grup (sześć doświadczalnych i dwie kontrolne). Czynnikiem doświadczalnym były: rodzaj nanocząstki węglowej (diament, grafit) oraz wielkość dawki (50, 500, 5000 µg/ml). Roztwór „badawczy" (3 ml), podawano do komory powietrznej przed rozpoczęciem inkubacji zarodka. Analizy, których celem było określenie potencjalnej toksyczności nanocząstek, wykonywane były w 19 dniu rozwoju zarodków. Podjęto również próbę poszukiwania mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za hamowanie rozwoju naczyń krwionośnych. Przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących białka: VEGFA (czynnik śródbłonka naczyń krwionośnych A) oraz bFGF (podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów), w miocytach serca zarodka kury.

Do istotnych wyników tych badań zaliczam wykazanie, że:

- nanocząstki diamentu i grafitu nie wpływały na masę serca zarodka kury, natomiast wpływały istotnie na zmniejszenie unaczynienia serca oraz unaczynienia błony kosmówkowo-omoczniowej,
- nanocząstki zarówno diamentu jak i grafitu, w stężeniach 50, 500, 5000 µg/ml, nie wykazywały toksyczności, o czym świadczy brak istotnych różnic: w masie zarodka, aktywności aminotransferaz (alaninowej i asparaginianowej) w surowicy krwi, w całkowitym potencjale antyoksydacyjnym (TAS) oraz w śmiertelności zarodków,
- najwyższa zastosowana dawka obu nanocząstek (5000 µg/ml) istotnie obniżyła ekspresję genu *bFGF,* co zostało potwierdzone na poziomie białka,
- nanocząstki zarówno diamentu jak i grafitu, w stężeniach 50, 500, 5000 µg/ml, nie wpływały istotnie na zmiany ekspresji genu kodującego VEGF).

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską pt. *Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych* oceniam pozytywnie. Podjęty przez doktoranta temat jest bardzo istotny, zarówno z naukowego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Stwierdzam, że wykorzystane techniki eksperymentalne, metody analiz laboratoryjnych i obliczeń statystycznych, umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wyników. Wysoko oceniam również poprawność prowadzenia dyskusji i wnioskowania.

Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że wykonane badania były pracochłonne i trudne, wymagały od doktoranta wiedzy, dużych umiejętności i doświadczenia eksperymentalnego. Jestem jednak przekonany, że ich wykonanie nie byłoby możliwe bez zaangażowania i pomocy ze strony pani promotor prof. dr hab. Ewy Sawosz-Chwalibóg oraz stworzonego przez Nią zespołu. Chciałbym również podkreślić, że problem badawczy ocenianej dysertacji jest zgodny z tematyką naukową realizowaną od wielu lat w Katedrze kierowanej przez panią profesor oraz, że badania te mogły być wykonane tylko w jednostce dobrze zorganizowanej, dysponującej nowoczesnym warsztatem badawczym i środkami finansowymi (projekt NCN).

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *Nanocząstki alotropowych form węgla jako czynniki modulujące mechanizmy rozwoju naczyń krwionośnych,* spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, o przyjęcie pracy doktorskiej Pana mgr Mateusza Wierzbickiego i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Jednocześnie, ze względu na innowacyjność badań i uzyskanych wyników, składam wniosek, do Wysokiej Rady Wydziału, o wyróżnienie rozprawy.

Szczecin, dnia 21 kwietnia 2014 roku

Prof. dr hab. Wiesław F. Skrzypczak