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 Marty Kutwin

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

nt.

Wpływ nanocząstek platyny $Pt^{(0)}$ na stan morfologiczno funkcjonalny wybranych komórek zwierząt modelowych i komórek glejaka wielopostaciowego łac. *Glioblastoma multiforme*

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach, SGGW w Warszawie 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. Glejak wielopostaciowy (*Glioblastoma multiforme*) jest złośliwym nowotworem CUN, charakteryzującym się wysoką aktywnością mitotyczną oraz nasiloną angiogenezą. Ma charakter naciekający, co sprawia, że w miarę wzrostu upośledza pracę sąsiadujących części układu nerwowego. Przy standardowej terapii (resekcja i agresywna chemioterapia i/lub radioterapia) rokowanie jest złe. Z powyższego powodu, w wielu ośrodkach naukowych poszukuje się alternatywnych metod terapii. Badania prowadzone od wielu lat, 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, mieszczą się właśnie w tym nurcie dociekań naukowych.

2. Pani mgr Marta Kutwin 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) przedłożyła rozprawę doktorską zatytułowaną: Wpływ nanocząstek platyny $Pt^{(0)}$ na stan morfologiczno funkcjonalny wybranych komórek zwierząt modelowych i komórek glejaka wielopostaciowego łac. *Glioblastoma multiforme*. Praca ta stanowi spójny tematycznie zbiór trzech oryginalnych prac naukowych:

1. Prasek M, Sawosz E, Jaworski S, Grodzik M, Ostaszewska T, Kamaszewski M, Wierzbicki M, Chwalibog A. *Influence of nanoparticles of platinum on chicken embryo development and brain morphology.* Nanoscale Research Letters, 2013, 8, 251. IF= 2,481 $_{[2014]}$, (30 pkt.)

2. Kutwin M., Sawosz E., Jaworski S., Kurantowicz N., Strojny B., Chwalibog A. *Structural damage of chicken red blood cells exposed to platinum nanoparticles and cisplatin.* Nanoscale Research Letters, 2014, 9, 257. IF= 2,481 $_{[2014]}$, (30 pkt.)
3. Kutwin M., Sawosz E., Jaworski S., Wierzbicki M., Hinzmann M., Grodzik M., Winnicka A., Chwalibog A. *Investigation of platinum nanoparticles properties against U87 Glioblastoma multiforme.* Archives of Medical Science, "Praca przyjęta do druku" IF= 2,030 $_{[2014]}$, (25 pkt.)

Powyższe prace są współautorskie, jednak we wszystkich, doktorantka jest pierwszym współautorem, a jej udział w projektowaniu i prowadzeniu badań oraz pisaniu pracy, jest znaczący i został oszacowany odpowiednio na 60, 65 i 50%. Prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, o czym świadczy łączny IF, który wynosi 6,992 $_{[2014]}$ oraz suma punktów wynosząca 85 $_{[2014]}$ (wg wykazu MNiSW).

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że mgr Marta Kutwin jest również współautorką 14 innych opublikowanych oryginalnych prac twórczych, których sumaryczny IF wynosi 38,187 oraz czterech innych publikacji. Jest współautorką trzech zgłoszeń patentowych, w tym dotyczącego wykorzystania nanocząstek platyny. Jest także kierownikiem projektu NCN i była współwykonawcą czterech innych projektów NCN oraz dwóch projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Odbyła trzy staże naukowe (Niemcy, RPA, Dania).

Integralną częścią rozprawy doktorskiej, poza kopiami ww. prac, jest autorskie ich opracowanie obejmujące następujące rozdziały: Wstęp, Hipoteza badawcza, cel i zakres pracy, Metodyka, Omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń, Podsumowanie i Wnioski. Poza wymienionymi wyżej rozdziałami praca zawiera również streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz stosowanych skrótów oraz wybrane pozycje piśmiennictwa dotyczące przedmiotowych zagadnień. Ponadto autorka zamieściła oświadczenia wszystkich współautorów cytowanych prac, o ich udziale w badaniach i publikacjach.

W tym miejscu jestem zmuszony stwierdzić, że między wartością merytoryczną prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, a zbiorczym opracowaniem tych prac przez doktorantkę, istnieje znacząca różnica jakościowa. Większość rozdziałów tego opracowania, została napisana zawiłym i mało precyzyjnym językiem, co sprawia, że są one mało czytelne. Doktorantka nie ustrzegła się także licznych błędów i uchybień, zwłaszcza stylistycznych i redakcyjnych. Zaznaczyłem je w maszynopisie rozprawy.

3. Charakterystyka prac będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej.

3.1. W pracy, *Influence of nanoparticles of platinum on chicken embryo development and brain morphology*, badała wpływ nanocząstek platyny na wzrost i rozwój embrionalny kurcząt oraz na morfologię tkanki nerwowej, wobec potencjalnej penetracji przez nanocząstki platyny bariery krew-mózg, w aspekcie wykorzystania ich w terapii glejaka.

W badaniach wykorzystano hydrokoloid nanocząstek platyny o wysokiej czystości (99,999%) i koncentracji 20 mg/kg (forma niejonowa platyny). Eksperymentalnie potwierdzono dużą stabilność hydrokoloidu (pomiar potencjału „zeta") oraz zwizualizowano nanocząstki, za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Udokumentowano, że ich średnica wahała się od 2 do 19 nm.

Badania przeprowadzono na modelu zarodka kurzego. Wykorzystano 150 zarodków podzielonych na sześć grup (n=25): kontrolną i pięć grup badawczych (dla różnych stężeń nanocząstek platyny – 1, 5, 10, 15, 20 µg/ml). Po 4 dniach inkubacji zapłodnionych jaj, do białka podawano roztwór nanocząstek platyny. W dwudziestym dniu inkubacji kurczęta dekapitowano i pobierano tkanki (kresomózgowie, serce, wątrobę, śledzionę, torebkę Fabrycjusza – do oceny prawidłowości rozwoju embrionalnego) oraz krew, w której analizowano: aktywność aminotransferazy asparainianowej i alaninowej, dehydrogenazy mleczanowej oraz fosfatazy zasadowej, a także stężenie glukozy i mocznika.

W wybranych losowo próbkach tkanki mózgowej (w obrębie grupy kontrolnej i trzech eksperymentalnych) wykonano analizy histologiczne (wizualizację po wybarwieniu hematoksyliną i eozyną) oraz immunohistochemiczne (z wykorzystaniem przeciwciał dla antygenu jądrowego proliferacji komórkowej PCNA – liczba komórek PCNA-pozytywnych była marą natężenia proliferacji). Badano także komórki apoptotyczne, w teście z poliklonalnymi przeciwciałami króliczymi „przeciw" kaspazie-3. Liczba komórek pozytywnych była miarą natężenia procesu apoptozy. Wykorzystując transmisyjny mikroskop elektronowy badano także zmiany na poziomie ultrastruktury komórek kresomózgowia w wybranych próbkach po zastosowaniu roztworu nanocząstek platyny o stężeniu 20 µg/ml.

Do istotnych wyników tych badań zaliczam przede wszystkim wykazanie wpływu nanocząstek platyny na: (i) obniżenie proliferacji komórek nerwowych kresomózgowia; (ii) zwiększenie natężenia procesu apoptozy w tych komórkach; (iii) ultrastrukturę komórek nerwowych, zwłaszcza destrukcyjny wpływ na poziomie mitochondriów; (iiii) brak negatywnego oddziaływania na wzrost i rozwój embrionów kurcząt oraz liczbę neuronów kresomózgowia.

3.2. Druga praca, *Structural damage of chicken red blood cells exposed to platinum nanoparticles and cisplatin*, dotyczy porównania wpływu dwóch form platyny na morfologię

i ultrastrukturę erytrocytów kurcząt. Wykorzystano nanocząstki platyny (w formie hydrokoloidu o stężeniu 2,6 µg/ml - postać niejonowa) oraz cisplatyny (roztwór wodny, o ekwiwalentnym do nanocząstek platyny, stężeniu – 4 µg/ml, forma jonowa).

Badania przeprowadzono na krwi pozyskanej z zarodków kurzych. Dwadzieścia zapłodnionych jaj inkubowano w standardowych warunkach, w okresie od 4 do 19 dnia. W 20. tym dniu kurczęta dekapitowano i pobierano krew, którą dzielono na cztery grupy: kontrolną (bez czynnika hemolizującego) i trzy doświadczalne (z dodatkiem 3% nadtlenku wodoru – 100% zhemolizowanych krwinek oraz z dodatkiem nanocząstek platyny i cisplatyny). Po trzygodzinnej inkubacji próbki krwi analizowano w mikroskopie świetlnym oraz skaningowym mikroskopie elektronowym. Mierzono także stężenie hemoglobiny w supernatancie.

Stwierdzono, że obie formy platyny powodują deformację struktury błon komórkowych i ich uszkodzenie, co skutkuje hemolizą i aglutynacją krwinek. Powodują także wzrost liczby patologicznych form erytrocytów. Wydaje się jednak, że wpływ nanocząstek platyny na te procesy jest bardziej znaczący.

3.3. Trzecia praca, *Investigation of platinum nanoparticles properties against U87 Glioblastoma multiforme*, dotyczy wpływu nanocząstek platyny i cisplatyny na morfologię i ultrastrukturę komórek glejaka wielopostaciowego linii U87 oraz tkankę guza.

Doświadczenie przeprowadzono w dwóch częściach: *in vitro* oraz *in vivo*. W pierwszej części inkubowano komórki glejaka, w czasie 24 godzin, z dodatkiem nanocząstek platyny w trzech stężeniach – 0,14; 0,29; 0,65 µM/ml oraz dodatkiem roztworu cisplatyny w ekwiwalentnych trzech stężeniach – 0,22; 0,44; 1,0 µM/ml. Odniesienie stanowiła grupa kontrolna.

Badano wpływ obu form platyny na morfologię (mikroskopia świetlna), ultrastrukturę (transmisyjna mikroskopia elektronowa), żywotność (pomiar gęstości optycznej), genotoksyczność (1-DE – test kometowy), natężenie procesów apoptozy i nekrozy (cytometria przepływowa).

Do istotnych wyników tej części badań zaliczam wykazanie, że nanocząstki platyny: (i) wpływają na obniżenie liczby komórek glejaka oraz na zmniejszenie ilości wypustek cytoplazmatycznych (niezależnie od zastosowanego stężenia i formy platyny); (ii) wpływają na zwiększenie liczby komórek z deformacjami struktury, zwłaszcza błon wewnętrznych mitochondriów (wyższe powinowactwo nanocząstek platyny, niż cisplatyny); (iii) obniżenie żywotności komórek (niezależnie od stężenia i formy platyny); (iiii) wykazanie aktywacji szlaku apoptozy (wyższa po zastosowaniu cisplatyny – 58%, niż nanocząstek platyny – 51%), oraz obniżenie natężenia nekrozy.

W drugiej części (badania *in vivo*), analizowano wpływ nanocząstek platyny, w roztworach o stężeniu 8,45 μM/ml oraz cisplatyny w roztworach o stężeniu 13,0 μM/ml, na tkankę guza glejaka wielopostaciowego linii U87.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na modelu zarodków kurzych. Zapłodnione jaja (n=60) inkubowano w czasie 6 dni, a następnie, na silikonowy krążek, umieszczony na błonie kosmówkowo-omoczniowej, nanoszono 30 μL roztworu zawierającego 3-4 x 10^6 komórek glejaka. Po kolejnych siedmiu dniach inkubacji zarodki z rozwijającym się glejakiem (n=36) podzielono losowo na grupy: kontrolną i dwie doświadczalne traktowane odpowiednią formą platyny podawanej w ilości 200 μL, bezpośrednio do guza. Po dwóch dniach guzy wycinano i poddawano badaniom.

Wykorzystując mikroskop stereoskopowy dokonano pomiarów i zdjęć guzów, a następnie szacowano ich objętość, określano masę, oceniano zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne, zmiany w ekspresji mRNA genów kodujących proapoptotyczne białka (kaspazę-3 i p53) oraz białko PCNA – marker proliferacji komórkowej, a także obrazowano (mikroskopia konfokalna) lokalizację tych białek w guzie.

Do istotnych wyników badań *in vivo* zaliczam wykazanie: (i) istotnego obniżenia masy i objętości guzów po podaniu nanocząstek platyny i cisplatyny; (ii) zmian ultrastruktury komórek, zwłaszcza w obrębie wewnętrznych błon mitochondrialnych; (iii) wzrostu ekspresji czynników proapoptotycznych i obniżenie ekspresji wskaźnika proliferacji komórkowej (niezależnie od zastosowanej formy platyny).

4. Korzystając z przywileju recenzenta chciałbym poprosić doktorantkę o krótki komentarz do następujących zagadnień: (i) na ile wyniki badań wyjaśniają mechanizm działania nanocząstek platyny i możliwość wykorzystania ich w terapii glejaka wielopostaciowego; (ii) jakie rezultaty badań wskazują na wysokie powinowactwo nanocząstek platyny do DNA i ich destrukcyjne działanie w tym obszarze; (iii) jakie przesłanki decydowały o wyborze dawek i czasu oddziaływania nanocząstek platyny - w poszczególnych doświadczeniach.

KONKLUZJA

Rozprawę doktorską pt. Wpływ nanocząstek platyny $Pt^{(0)}$ na stan morfologiczno funkcjonalny wybranych komórek zwierząt modelowych i komórek glejaka wielopostaciowego łac. *Glioblastoma multiforme* oceniam pozytywnie.

Podjęty przez doktorantkę temat (cel) pracy uważam za wyjątkowo istotny, zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Założenia metodyczne prac, wykorzystane innowacyjne techniki eksperymentalne, wysokospecjalistyczne procedury i metody analityczne oraz aplikacje bioinformatyczne i metody analizy statystycznej,

umożliwiły uzyskanie wiarygodnych wyników. Wnioski mają pełne uzasadnienie w przeprowadzonych doświadczeniach i powinny stanowić inspirację do dalszych badań.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska 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 pani mgr Marty Kutwin i dopuszczenie pracy do publicznej obrony.

Szczecin, dnia 15 października 2015 roku

Prof. dr hab. Wiesław P. Skrzypczak