



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Prof. dr hab. inż. Dorota Światła-Wójcik

Łódź, 21.06.2022

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, PŁ

Żeromskiego 116, 90-924 Łódź

## RECENZJA

### rozprawy doktorskiej mgr Anny Lichoty

nt. „Właściwości fizykochemiczne i biologiczne nanocząstek fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$ ”

Przedstawiona mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Anny Lichoty została wykonana na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Tematyka rozprawy wpisuje się w badania prowadzone w zespole Pani dr hab. Anity Krokosz, prof. UŁ, promotora pracy. Rozprawa została przygotowana w formie tzw. „spinki”, zawierającej kolejno: informację o źródłach finansowania i współpracy naukowej, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, zwięzły opis wykonanej pracy badawczej wraz z bibliografią oraz streszczeniem w jęz. polskim i angielskim (w sumie 22 strony), spis publikacji niewchodzących w skład rozprawy, wykaz doniesień konferencyjnych, informację o zatrudnieniu w ośrodkach naukowych, udziale w projektach i stażach naukowych, uzyskanych nagrodach oraz działalności organizacyjnej Doktorantki. Kopie czterech artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów zostały dołączone w formie załączników (odpowiednio Załącznik 1 oraz Załącznik 2). Zgodnie ze spisem publikacji przedstawionym na str. 5 rozprawy są to:

1. Lichota A., Szabelski M., Krokosz A., *Quenching of protein fluorescence by fullereneol  $C_{60}(OH)_{36}$* . Manuskrypt wysłany do redakcji Molecules, wyd. MDPI (bieżący IF 4,412; MEiN 140): 50-procentowy udział Doktorantki obejmował m. in. zaplanowanie i wykonanie eksperymentów (z wyjątkiem pomiarów wygaszania fluorescencji).
2. Lichota A., Piwoński I., Michlewska S., Krokosz A., *A multiparametric study of internalization of fullereneol  $C_{60}(OH)_{36}$  nanoparticles into peripheral blood mononuclear cells: cytotoxicity in oxidative stress induced by ionizing radiation*, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020), 2281. (bieżący IF 5,924; MEiN 140): 50-procentowy udział Doktorantki

obejmował m. in. zaplanowanie i wykonanie prac doświadczalnych (z wyjątkiem mikroskopii sił atomowych i konfokalnej).

3. Lichota A., Krokosz A., *Fulerenole w terapii i diagnostyce chorób nowotworowych*, Medycyna Pracy, 67 (2016), 817-831. (bieżący IF 2021-2022 0,914; MEiN 40): 70-procentowy udział Doktorantki.
4. Krokosz A., Lichota A., Nowak K., Grębowski J., *Carbon nanoparticles as possible radioprotectors in biological systems*, Radiat. Phys. Chem., 128 (2016) 143–150. (bieżący IF 2,858; MEiN 70): 35-procentowy udział Doktorantki.

Pozycje 1 i 2 to oryginalne artykuły naukowe, a kolejne dwie to prace o charakterze przeglądowym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR, a więc podlegały ocenie merytorycznej co najmniej 8 recenzentów (poprawiony manuskrypt pierwszej z prac oczekuje na akceptację do druku). Moja rola sprowadza się więc przede wszystkim do oceny części opisowej (Rozdziały 4-7) oraz stwierdzenia zgodności całokształtu rozprawy z wymogami ustawowymi i wytycznymi Rady Doskonałości Naukowej UŁ.

Mgr Anna Lichota postawiła sobie za cel zbadanie właściwości nanocząstek fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$  pod kątem rozpuszczalności w roztworach wodnych, akumulacji we wnętrzu komórek oraz zdolności oddziaływania z różniącymi się strukturalnie białkami. Dynamiczny wzrost zainteresowania projektowaniem wyspecjalizowanych nanocząstek wynika z ich szerokiego zastosowania w inżynierii, przemyśle kosmetycznym, biologii i medycynie. Dzięki rozwojowi nanomedycyny możliwe staje się skuteczniejsze i mniej inwazyjne leczenie chorób nowotworowych, a także ich bezpieczniejsze diagnozowanie.

Fulerenole to nanocząstki powstałe na bazie fulerenu w wyniku przyłączenia grup funkcyjnych, np. hydroksylowych, czy karboksylowych. Z uwagi na zastosowania biomedyczne szczególne znaczenie ma podstawienie hydrofilowymi grupami hydroksylowymi, ponieważ rozwiązuje problem niskiej rozpuszczalności fulerenu w układach wodnych. Hydroksyfulereny syntezowane na bazie  $C_{60}$  należą do najczęściej badanych. Potencjalne zastosowania tych związków w nanomedycynie zostało szeroko omówione w trzech artykułach przeglądowych współautorstwa Doktorantki (dwóch wchodzących w skład rozprawy i niewłączonego do rozprawy artykułu: Lichota A., Łysio M., Krokosz A., *Toksyczność hydroksyfulereny  $C_{60}(OH)_x$ ,  $x > 30$  w kontekście zastosowań biomedycznych i w przemyśle kosmetycznym*, Przemysł Chemiczny, 95 (2016), 2190-2194) oraz krótko scharakteryzowane w Rozdziale 4.1 rozprawy.

Właściwości fizykochemiczne i biologiczne hydroksyfulereny  $C_{60}(OH)_n$  w dużej mierze zależą liczby podstawników  $n$ . Część doświadczalna pracy Doktorantki dotyczy fulereny  $C_{60}$  podstawionego 36-cioma grupami hydroksylowymi. Tematykę i cel pracy doktorskiej należy uznać za ważny i jak najbardziej aktualny. Część badawcza pracy została podzielona na trzy cele szczegółowe obejmujące:

- (1) charakterystykę właściwości fizykochemicznych fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$ ;
- (2) ocenę oddziaływania fulerenolu  $C_{60}(OH)_{36}$  z albuminą osocza krwi człowieka (HSA) i dehydrogenazą alkoholową (ADH);
- (3) ocenę toksyczności  $C_{60}(OH)_{36}$  wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka (PBMCs).

Wybór i kolejność realizacji celów szczegółowych jest logiczny i prawidłowy. Mam natomiast pewne wątpliwości co do sformułowania hipotezy badawczej (Rozdział 4.2, str. 8). Według mnie właściwsze byłoby ujęcie w formie implikacji, np: „Zakładając, że nanocząstki fulerenolu wnikają do wnętrza komórek, to czy ma to wpływ na ich przeżywalność, wiązalność z białkami ...”

Do realizacji celów szczegółowych Doktorantka wykorzystała szereg metod doświadczalnych, w tym nowoczesnych technik obrazowania oddziaływań, jak mikroskopia AFM i konfokalna. Metodyka badań (Rozdział 4.3) obejmowała: spektroskopię UV-Vis, IR, NMR, pomiary fluorescencyjne, spektrometrię mas, techniki dynamicznego rozpraszania światła, mikroskopię AFM i konfokalną, pomiary potencjału elektrokinetycznego (tzw. potencjału zeta lub dzeta), cystometrię przepływową. W mojej opinii, zastosowaniem tak wielu różnych metod doświadczalnych mgr Lichota udowodniła dobre przygotowanie do prowadzenia badań, rozeznanie i umiejętność doboru technik eksperymentalnych oraz skuteczność współpracy z zespołami dysponującymi potrzebną aparaturą.

Przejdę teraz do skomentowania opisu części doświadczalnej (Rozdziały 4.4 - 4.6). W pierwszym etapie Doktorantka samodzielnie wykonała syntezę nanocząstek  $C_{60}(OH)_{36}$ , potwierdziła ich strukturę, wykonała pomiary rozmiaru nanocząstek oraz potencjału zeta w wodzie i buforze Na-fosforanowym (0,02 M, pH 7,4), a także przeprowadziła analizę właściwości spektralnych. Z badań tych wynika, że nanocząstki fulerenolu tworzą układy polidyspersyjne o wielkości od 40 do 187 nm, a po oderwaniu powłoki wodnej średnica nanocząstki maleje do około 2 nm. Wartości potencjału zeta w wodzie i w buforze wynoszą odpowiednio -27,5 mV i -37,4 mV. W tym miejscu prosiłabym o wyjaśnienie: czym podyktowany był wybór buforu oraz o czym świadczy obniżenie potencjału zeta w buforze i jakie ma to przełożenie na tzw. promień ścinania. Interesowałoby mnie również porównanie

rozpuszczalności  $C_{60}(OH)_{36}$  w wodzie i buforze. Dalsze badania dotyczyły roztworów  $C_{60}(OH)_{36}$  i białek ADH oraz HSA. Analiza widm absorpcyjnych UV-Vis wykazała stabilność i brak agregacji  $C_{60}(OH)_{36}$  w zakresie stężeń od 2,64  $\mu M$  do 133,36  $\mu M$ , co pozwoliło na wyznaczenie współczynników ekstynkcji  $\epsilon_{280nm}$  składników roztworu. Ocenę zdolności wiązania  $C_{60}(OH)_{36}$  z białkami Doktorantka przeprowadziła w oparciu o pomiary fluorescencyjne. Analizując zależność natężenia fluorescencji i czasu życia stanów wzbudzonych białek od stężenia  $C_{60}(OH)_{36}$  (wygaszacz), Pani Lichota stwierdziła jednocześnie występowanie wygaszania dynamicznego (zderzeniowego) i statycznego (z utworzeniem kompleksu z wygaszaczem). Ponieważ dodatkowo został zasugerowany udział mechanizmu „sphere-of-action quenching”, prosiłabym o skomentowanie przesłanek skłaniających do wysnucia takiego wniosku. Wynikiem realizacji trzeciego etapu harmonogramu było wykazanie braku toksyczności  $C_{60}(OH)_{36}$  wobec PBMCs. Wynik ten otwiera pole do jego potencjalnych zastosowań biomedycznych. Negatywnie natomiast wypadła ocena właściwości radioprotekcyjnych  $C_{60}(OH)_{36}$ . Biorąc pod uwagę potencjalne zastosowania medyczne wyników pracy nasuwa się pytanie o wpływ temperatury na badane właściwości  $C_{60}(OH)_{36}$  (badania zostały wykonane w temperaturze pokojowej, czyli o 12-15  $^{\circ}C$  niższej od temperatury ciała ludzkiego). Podsumowując, część doświadczalna pracy stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego celu naukowego, a jednocześnie dostarcza wartościowych przesłanek i wskazówek do ewentualnych zastosowań praktycznych.

Układ części opisowej rozprawy jest poprawny zarówno w sensie konstrukcji jak i języka (może z wyjątkiem użycia formy bezosobowej). Moje zastrzeżenia budzi natomiast skąpa bibliografia (Rozdział 5), obejmującą zaledwie 13 pozycji, z czego cztery to odnośniki do artykułów wchodzących w skład rozprawy. Z obowiązku recenzenta, poniżej wymieniam dostrzeżone w tekście nieścisłości oraz uchybienia edytorskie: Str. 6: brak wyjaśnienia, jak rozumieć pojęcie wiązania  $sp^{2,5}$ ; Str. 7 (środkowy akapit): nieprecyzyjne sformułowanie: spektrofлуориметрия jest odmianą metody spektrofotometrycznej; Str. 8 (cele szczegółowe): brak wyjaśnienia, czym podyktowany był wybór białek, stosowne wyjaśnienie znajduje się dopiero na str. 11; Str. 11: jest „wykonano widma” zamiast „wykonano pomiary widm”; jest „proporcjonalny od stężenia” zamiast „proporcjonalny do stężenia”; stężenia czego?; jednostka współczynnika ekstynkcji: IUPAC zaleca stosowanie dużej litery L na oznaczenie litra; Str. 12: „przy najwyższych stężeniach nanocząstek” - czyli jakich?; Str. 13: brak numeru równania; „zdolność absorpcji, przenikania związków do komórek” – w kontekście wcześniej omawianych widm słowo „absorpcji” jest mylące i zbędne. Poza tym wskazane

byłoby zamieszczenie ilustracji graficznej widm omawianych na str. 10-11 oraz wykresów Sterna-Volmera (str. 12); natomiast niepotrzebne są powtórzenia objaśnień skrótów IR, NMR, AFM, DLS, itd. oraz opisu struktury HSA.

Pani mgr Anna Lichota jest współautorem w sumie 10 publikacji naukowych oraz 28 doniesień konferencyjnych, w tym 11 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych, odbyła trzy krótkoterminowe staże naukowe: w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi (01-26.07.2013), w Łódzkim Parku Naukowo-Technologicznym (02.07-02.08.2015) oraz w Katedrze Fizyki i Biofizyki Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (22-29.01.2018). Pani Lichota jest laureatką pięciu nagród uczelnianych i konferencyjnych oraz beneficjentką kilku dotacji uczelnianych, jest członkiem dwóch towarzystw naukowych (PTB i PTBR), uczestniczyła w organizacji konferencji naukowych i wydarzeń popularyzujących naukę, była również członkiem licznych komisji uczelnianych i wydziałowych. Tak wielostronna działalność organizacyjna bez wątpienia zasługuje na uznanie. Przypuszczam jednak, że w połączeniu z zaangażowaniem w pracę z innymi zespołami (od 2018 r. zatrudnienie na UM w Łodzi) mogło mieć wpływ na stosunkowo długi okres realizacji doktoratu (rozpoczęcie studiów doktoranckich w 2014 r.).

Biorąc pod uwagę całokształt rozprawy, aktualność i wysoki poziom naukowy części badawczej, stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki ustawowe oraz zwyczajowe dotyczące przewodów doktorskich. W związku z tym, wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Lichoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

