



UNIwersYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Analizy Środowiska



80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18, tel. (+48 58) 523 5448, e-mail: sox@chem.ug.edu.pl

Prof. dr hab. Piotr Stepnowski
profesor zwyczajny

Gdańsk, dnia 19 kwietnia 2013 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Gajewicz pod tytułem „Opracowanie metod *in silico* służących przewidywaniu cytotoksycznego wpływu nanocząstek tlenków nieorganicznych na komórki bakterii *E. coli* oraz ludzkie keratynocyty (HaCaT)”

Ocena ryzyka środowiskowego substancji i preparatów chemicznych na stałe wpisała się w proces ich projektowania i wytwarzania i jest dziś integralnym elementem obrotu gospodarczego chemikaliami. Jednym z najobszerniejszych elementów tego procesu jest ocena toksykologiczna i ekotoksykologiczna związków chemicznych prowadzona na różnych poziomach organizacji biologicznej. Punktem wyjścia są tu zwykle badania toksyczności ostrej z użyciem wybranych gatunków bakterii (np. *Vibrio fischeri*, *E. coli*), eukariotycznych linii komórkowych (np. komórki raka szyjki macicy HeLa, szczurze komórki białaczkowe IPC-81) czy glonów (np. *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*). Co prawda, pełny obraz aktywności biologicznej substancji czy preparatu chemicznego uzyskiwany jest dopiero po ocenie działania chronicznego wobec organizmów wyższych, to jednak wstępna ewaluacja toksykologiczna z użyciem testów komórkowych ma kapitalne znaczenie dla uchwycenia podstawowych zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną (tzw. t-SAR, *ang.* thinking in terms of Structure Activity Relationship).

W 2007 roku do systemu prawnego Unii Europejskiej wprowadzono sformalizowane regulacje dotyczące rejestracji, oceny ryzyka i dopuszczania do obrotu substancji chemicznych pod wspólną nazwą REACH (*ang.* Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). W systemie tym obok metod laboratoryjnej ewaluacji toksykologicznej substancji chemicznych zaleca się także stosowanie metod analizy komputerowej (*in silico*), przy czym główną przesłanką tych rekomendacji jest stopniowe zastępowanie badań z użyciem zwierząt kręgowych. Jedną z dwóch najważniejszych metod jest tu ilościowe modelowanie zależności struktura chemiczna – aktywność biologiczna (tzw. QSAR, *ang.* Quantitative Structure Activity Relationship), które obecnie jest z powodzeniem wykorzystywane do przewidywania toksyczności i ekotoksyczności, ale też podstawowych parametrów rozprzestrzeniania się substancji chemicznych w środowisku (np. czasów półtrwania, biokoncentracji, współczynników podziału między różne fazy środowiskowe i in.).

Metody QSAR stały się także podstawowym warsztatem badawczym Pani mgr Agnieszki Gajewicz, która w swojej pracy doktorskiej postanowiła zweryfikować ich użyteczność do określenia wybranych właściwości fizykochemicznych nanocząstek tlenków nieorganicznych,



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 26. 04. 2013

L.dz. 2.dz. 8010-WCH/IP-796/13

które z kolei mogą mieć wpływ na toksyczność komórkową tych układów. Praca doktorska została wykonana w Pracowni Chemometrii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pana dr hab. Tomasza Puzyna, prof. UG, młodego naukowca, który na polu wykorzystania metod chemometrycznych w ocenie zagrożeń chemicznych środowiska odniósł już wiele spektakularnych sukcesów zauważonych przez międzynarodową społeczność naukową.

Wybrana przez kandydatkę tematyka pracy doktorskiej jest nie tylko bardzo interesująca z naukowego punktu widzenia ale i niezwykle ambitna. Do tej pory, metody QSAR w odniesieniu do nanomateriałów wykorzystywane były bardzo rzadko, głównie ze względu na niejednoznaczność konserwatywnych parametrów fizykochemicznych tego typu układów w porównaniu z konwencjonalnymi strukturami molekuł.

Praca ma układ typowy. Całość rozprawy obejmuje 194 stron maszynopisu i podzielona jest na 8 rozdziałów. Spis piśmiennictwa obejmuje 302 pozycje. W pracy umieszczono 25 tabel i 53 rysunków.

Po krótkim wstępie doktorantka zaprezentowała zwięzłą ale bardzo dobrze napisaną charakterystykę nanomateriałów, koncentrując się na historii, podstawowej klasyfikacji i co najważniejsze właściwościach fizycznych i chemicznych, które wynikają z budowy tych układów. Mimo iż do powszechnej świadomości świata nauki dociera coraz więcej faktów na temat niezwykłej specyfiki tych materiałów to jednak prawdopodobnie wciąż nie jesteśmy w stanie w pełni wykorzystać możliwości technologicznych nanocząstek. Autorka przytaczając przykładowe obszary zastosowań nanomateriałów pisze, może nieco przesadnie, o „Złotej erze” nanotechnologii, głównie w obrębie współczesnej elektroniki, optyki, medycynie, farmakologii i kosmetyki. Jednak prostą konsekwencją wszechobecności nanomateriałów stała się także ich coraz powszechniejsza obecność w środowisku naturalnym.

W tej części pracy znalazła się także przekrojowa charakterystyka metod QSAR opisująca stosowane algorytmy, klasyfikację deskryptorów, a także zestaw „dobrych praktyk” służący wiarygodnej ocenie uzyskiwanych wyników. Jako eksperymentalistę cieszy mnie, iż doktorantka każdorazowo podkreśla wagę jakości danych empirycznych dla dalszego procesu modelowania, nie zachłystując się „nieograniczonymi możliwościami” jakie stawać by się mogło dając nam metody *in silico*. Rozdział ten kończy krótki przegląd dotychczasowych zastosowań metod QSAR do opisu cech nanomateriałów.

Następnie zaprezentowano hipotezy i cele badawcze. Doktorantka mówi o czterech hipotezach podczas gdy z łatwością można by je zamknąć w jednej zwięzłej hipotezie. Podobnie rzecz się ma z celami pracy, których podano jedenaście, a które powinny pełnić rolę celów szczegółowych poprzedzonych jednym celem głównym, którego autorka nie sformułowała.

Następująca po tym część metodyczna natomiast, napisana jest bardzo dobrze i przejrzysto. Przedstawiono etapy metodyki wyznaczania deskryptorów, metodologii opracowania uproszczonych modeli molekularnych (umożliwiających zastosowanie modelowania na poziomie metod *ab initio*) oraz ocenę adekwatności zastosowanych metod kwantowo-mechanicznych. Omówiono też metodologię zastosowania wybranych (obliczonych i uzyskanych z TEM) deskryptorów do modelowania aktywności biologicznej nanocząstek tlenków nieorganicznych. W części metodologicznej pracy kandydatka zawarła również przegląd metod kwantowo-mechanicznych i chemometrycznych wykorzystywanych w badaniach własnych.

Najobszerniejszą częścią rozprawy jest prezentacja uzyskanych przez doktorantkę wyników badań. Większość z uzyskanych przez kandydatkę wyników oceniam bardzo wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia doktorantki uważam:

- Opracowanie metodyki obliczenia deskryptorów strukturalnych odzwierciedlających wielkość cząstki, kształt, porowatość oraz powierzchnię, na podstawie fotograficznej rejestracji obrazu z wykorzystaniem TEM. Przedstawiona koncepcja jest prawdopodobnie pierwszą próbą wykorzystania deskryptorów, które pochodzą z analizy obrazu mikroskopowego w ocenie ryzyka chemicznego stwarzanego przez nanomateriały.
- Opracowanie efektywnej metodyki budowy uproszczonych modeli molekularnych, reprezentujących fragmenty powierzchni nanocząstek tlenków nieorganicznych, która umożliwiła wyznaczenie deskryptorów kwantowo-mechanicznych wyrażających specyfikę nanostruktury.
- Wykazanie, że właściwości elektronowe nanocząstek MeOx zmieniają się w dwojaki sposób: w sposób liniowy lub do punktu nasycenia. Uzyskane wyniki mają bardzo praktyczne znaczenie w kontekście obliczeń deskryptorów kwantowo-mechanicznych do rozwoju opracowywanych metod *in silico*.
- Wykazanie użyteczności metod QSAR w ocenie ryzyka dla nanomateriałów do oceny cytotoksycznego wpływu nanocząstek tlenków metali i metaloidów na komórki bakterii *E. coli* oraz komórki ludzkiej linii komórkowej karatynocytów
- Opracowanie koncepcji szacowania brakujących danych toksykologicznych w oparciu o tzw. grupowanie i podejście przekrojowe (ang. *grouping* i *read-across*) - Zasadniczą zaletą opracowanej metody grupowania i szacowania przekrojowego - decydującą o jej przewadze nad metodami QSAR - jest fakt, iż nie wymaga ona dużej ilości danych potrzebnych do zdefiniowania grup indywiduów o podobnej toksyczności
- Wykazanie różnic w mechanizmie indukowania odpowiedzi cytotoksycznej przez nanocząstki tlenków metali i metaloidów na poziomie komórkowym (komórki bakterii *E. coli* oraz ludzkich karatynocytów, HaCaT) oraz wskazanie na: morfologię komórki, wielkość nanocząstki oraz łatwość uwalniania kationów metali/metaloidów z powierzchni nanocząstki
- Stworzenie skryptu w języku MATLAB, który umożliwia automatyczną kalibrację i walidację dowolnego modelu QSAR w oparciu o metodę regresji wielokrotnej.

Z kolei poniżej wymieniam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- Postulowany przez kandydatkę (ale też innych autorów) mechanizm działania toksycznego nanocząstek badanych tlenków metali opiera się na założeniu odrywania kationów metali z powierzchni nanomateriału, które oddziałują dalej z danym układem biologicznym. Czy w tym założeniu nie należałoby uwzględnić także potencjalnej asocjacji uwolnionych kationów z dostępnymi w środowisku ekspozycji anionami (organicznymi i nieorganicznymi), które mimo wszystko ograniczyłyby biodostępność uwolnionego kationu?

- Czy biorąc powyższe pod uwagę można by rozszerzyć zastosowanie opracowanego przez autorkę modelu do oceny toksyczności takich nanomateriałów wobec glonów wód brakicznych czy morskich – powszechnie wykorzystywanych w testach ekotoksykologicznych ?
- Czy i na ile metody *in silico* - opracowane w oparciu o jeden lub dwa deskryptory teoretyczne - są wiarygodne? Czy nie jest to zbyt uproszczenie rzeczywistości?
- Jakie jest prawdopodobieństwo praktycznego zastosowania opracowanych przez kandydatkę metod *in silico* w przemyśle i procedurach rutynowych?
- Czy z ekonomicznego punktu widzenia, celowe jest obliczanie deskryptorów pochodzących z analizy obrazu mikroskopowego? Czy nie byłoby taniej wykonać odpowiednie badania eksperymentalne na poziomie *in vitro* lub *in vivo*?
- Czy uprawnione jest stosownie terminu „cytotoksyczność” w odniesieniu do oceny toksyczności bakterii? Wg mnie termin ten zarezerwowany jest dla toksykologii komórek eukariotycznych

Przytoczone wątpliwości nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr Agnieszki Gajewicz zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał badawczy, a Kandydatka wykazała się ponadto doskonałą znajomością technik komputerowych.

Kandydatka jest autorką 10 publikacji naukowych opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach naukowych, z których 3 powstało w wyniku realizacji badań doktorskich. Należy przytoczyć także jej wskaźniki scjentometryczne, które mogą budzić podziw, biorąc pod uwagę młody wiek kandydatki: łączna wartość współczynnika wpływu IF wszystkich opublikowanych prac wynosi ponad 62, liczba cytowań (bez autocytowań) wynosi 64, a Indeks Hirscha jest równy 4. Doktorantka jest ponadto współautorem 2 rozdziałów w książkach opublikowanych przez prestiżowe wydawnictwa międzynarodowe. Wyniki swoich badań kandydatka prezentowała (w formie 3 wykładów i 20 posterów) podczas kilku konferencji o zasięgu zarówno krajowym jak i międzynarodowym. W czasie przewodu doktorskiego kandydatka odbyła pięć staży naukowych w USA i Japonii oraz była laureatką trzech konkursów stypendialnych oraz czterech nagród za osiągnięcia naukowe.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Gajewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na względzie ponadprzeciętny dorobek kandydatki oraz jej dotychczasową aktywność naukową zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

