



Dr hab. med. Maciej Stępnik, prof. nadzw.
Zakład Toksykologii i Kancerogenezy
E-mail: mstep@imp.lodz.pl

Łódź, 2016-05-27

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Natalii Syzochenko, pt.

„Optimal selection of descriptors for structure-activity modeling of nanoparticles based on causality analysis”

Przedłożona do recenzji rozprawa mgr Natalii Syzochenko została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Tomasza Puzyna, Prof. UG.

W ocenie substancji chemicznych pod kątem ich bezpiecznego stosowania (tj. w celu wyeliminowania substancji posiadających potencjalne właściwości toksyczne) modele QSAR odgrywają coraz ważniejszą rolę. Ma to istotne znaczenie ze względu na wysokie koszty związane z rejestracją chemikaliów na terenie Unii Europejskiej i nie tylko, a z drugiej strony ze względu na coraz większe sprzeciwy, głównie etyczne, wobec stosowania zwierząt do oceny toksyczności. Modele QSAR pozwalają skutecznie przewidywać właściwości substancji przydatne dla określenia zagrożenia przez nie stwarzanego i szacowania ryzyka rozwoju zmian chorobowych po narażeniu na nie. Na liście modeli QSAR rozwijanych dla celów regulacyjnych (np. system REACH w UE), nieustannie pojawiają się nowe pozycje. W związku z pojawianiem się na rynku lawinowo rosnącej liczby produktów codziennego użytku zawierających składniki w formie nanocząstkowej, istnieje coraz większa potrzeba testowania tych składników w kierunku potencjalnej toksyczności. Ponieważ dotychczasowe wyniki badań toksykologicznych sugerują, iż właściwości substancji w formie nano- mogą w wielu przypadkach zdecydowanie różnić się od formy standardowej, sugeruje się, że dotychczas stosowane, tradycyjne metody toksykologiczne mogą być niewystarczające w przypadku form nano. W związku z tym poszukuje się nowych metod, lub też adaptuje już istniejące. Choć zakres wiedzy z dziedziny nanotoksykologii już jest imponujący, to jednak wiele pytań o mechanizmy toksyczności nanocząstek nadal pozostaje bez odpowiedzi.

W pracy skierowanej na poszukiwanie niezawodnych metod przewidujących efekty toksyczne nanocząstek doskonale wpisuje się przedłożona rozprawa doktorska, której Autorka przedsięwzięła sobie za cel m.in.: **a)** opracowanie nowych deskryptorów strukturalnych odzwierciedlających właściwości nanocząstek w zależności od ich wielkości i kształtu, **b)** zaproponowanie hierarchicznej kombinacji deskryptorów opisujących strukturę nanocząstek na różnych poziomach ich organizacji (od jonów i pojedynczych cząstek do agregatów) oraz **c)** próbę zastosowania metod analizy przyczynowej jako dodatkowych kryteriów walidacyjnych pomocnych przy interpretacji mechanizmów toksyczności.

Ośrodek Współpracujący z WHO





Rozprawa doktorska mgr Syzochenko to maszynopis napisany w języku angielskim liczący 64 strony, 126 pozycji piśmiennictwa, z dołączonymi 4 pracami oryginalnymi (łącznie 38 stron), stanowiącymi podstawę przygotowanej rozprawy wraz ze stosownymi deklaracjami autorki oraz promotora, jak również oświadczeniami współautorów (łącznie 15 stron). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) 4 prac badawczych związanych z rozprawą doktorską jest wysoki i wynosi 23.4, przy sumarycznej punktacji MNiSW równej 150.

Układ pracy odbiega od standardowego, niemniej jednak należy podkreślić, iż całość rozprawy ma układ przejrzysty i logiczny, zaś styl językowy nie budzi zastrzeżeń. We wstępnym rozdziale podsumowującym przeprowadzone badania Autorka przedstawia problematykę związaną z różnicami we właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych pomiędzy formami nano i standardową substancji, i związanych z tym nowych strategiach testowania i szacowania ryzyka dla form nano. W podrozdziale poświęconym metodologiom modelowania QSAR, opisane zostały m.in. rodzaje stosowanych deskryptorów molekularnych, kryteria ich selekcji, systemy samouczące się do opisu zależności pomiędzy właściwościami substancji a ich strukturą, jak również metody walidacji i interpretacji modeli QSAR. Szczególną uwagę Autorka zwraca na wyzwania i perspektywy badań nad deskryptorami nano-QSAR, opisane w rozprawie w podrozdziale opartym na opublikowanej pracy przeglądowej w *J. Nanotoxicology Nanomedicine* w 2016 roku. Podrozdział ten zwięźle wprowadza czytelnika w następujący po nim opis problemów badawczych, które Autorka zdecydowała się rozwiązać w swej rozprawie oraz przyświecające temu główne hipotezy badawcze.

Po tych informacjach wstępnych Autorka przedstawia w kolejnych rozdziałach swe znakomite osiągnięcia badawcze, w formie osobnego, zwięzłego podsumowania każdej z 4 prac oryginalnych. Wśród tych osiągnięć należy wymienić:

- **opracowanie nowych, teoretycznych deskryptorów strukturalnych do modelowania nano-QSAR i ich udane zastosowanie do przewidywania przewodnictwa cieplnego nanopłynów** (*J. Phys. Chem. C* 2015, 119: 25542-25547). Zastosowany model wykorzystywał teoretyczne deskryptory modelu „cieklej kropli” (LDM) oraz deskryptory wyprowadzone doświadczalnie. Niewątpliwą zaletą opracowanych deskryptorów jest to, że nie wymagają złożonych lub długotrwałych obliczeń, i mają uzasadnienie we współczesnych teoriach przewodnictwa cieplnego nanopłynów;

- **nowatorskie opracowanie panelu deskryptorów doświadczalnych (wielkość pojedynczej nanocząstki, po agregacji, oraz punkt zerowy potencjału zeta) oraz teoretycznych (opartych na modelu LDM, podejściu SiRMS, i charakterystyce jonowej z zastosowaniem teorii wiązań metal-ligand) opisujących strukturę nanocząstek na różnych poziomach organizacji, do przewidywania cytotoksyczności nanocząstek tlenków metali**. Modele te z powodzeniem zastosowano do analizy porównawczej cytotoksyczności na komórki bakteryjne *E. coli* oraz keratynocyty człowieka HaCaT (*Nanoscale* 2014, 6: 13986-13993), jak również na komórki linii wyprowadzonej z nabłonka płuc człowieka BEAS-2B i komórki linii białaczki monocytarno-makrofagowej myszy RAW 264.7 (*RSC Advances* 2015, 5: 77739-77745);



- wykazanie przydatności metod analizy przyczynowej do modelowania biologicznej aktywności nanocząstek na przykładzie efektów cytotoksycznych nanocząstek tlenków metali na komórki ssaków linii BEAS-2B oraz RAW 264.7 (*RSC Advances* 2015, 5: 77739-77745) oraz komórki bakterii *E. coli* (*Nanoscale* 2016, 8: 7203-7208).

Część opisową przeprowadzonych badań zamykają ogólna dyskusja oraz wnioski wraz z pokrótce nakreślonymi przez Autorkę przyszłymi kierunkami badań nad modelami nano-QSAR.

W trakcie analizy przedłożonej rozprawy nasunęły mi się następujące wątpliwości/pytania:

1. Uwaga ogólna: w wielu miejscach Autorka w stosunku do wybranych linii komórkowych człowieka używa określenia „normalne komórki” w odróżnieniu od komórek myszy określanymi mianem „nowotworowe”. Otóż, należy pamiętać, że prawie wszystkie ustalone linie komórkowe tzw. uniesmiertelnione (tj. cechujące się nieograniczonym wzrostem), choć pod wieloma względami mają identyczne cechy z komórkami pierwotnymi (izolowanymi bezpośrednio z organizmu), to jednak posiadają pewne wyjątkowe cechy morfolologiczne i cytogenetyczne, które umożliwiają taki nieograniczony wzrost. Dla przykładu, linia HaCaT (od ang. **H**uman **a**dult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated Temperature) wyprowadzona w specjalnych warunkach hodowlanych, swój stransformowany fenotyp *in vitro* zawdzięcza obecności określonych zmian chromosomowych (aberracji). Również linia BEAS-2B swój nieograniczony wzrost zawdzięcza obecności w ich genomie fragmentu DNA hybrydy adenowirusa typ 12 z wirusem SV40 kodującego antygen T, który ma zdolność do hamowania aktywności białka p53. Dlatego też, uogólnianie wniosków co do efektów toksycznych, oparte na wynikach uzyskanych na ustalonych liniach, może niejednokrotnie być obarczone błędem. Dla celów regulacyjnych najbardziej wartościowe są wyniki uzyskiwane na komórkach pierwotnych.
2. Dobór linii komórkowych dla opracowania modeli QSAR nie jest dla mnie całkowicie jasny, mam na myśli porównanie efektów cytotoksycznych nanocząstek na komórkach bakteryjnych i ssaków, w tym komórek od różnych gatunków (człowiek vs. mysz) oraz o diametralnie różnych fenotypach (komórki nabłonkowe vs. makrofagi), co wiąże się również z zasadniczymi różnicami w składzie podłoży hodowlanych, mechanizmach internalizacji nanocząstek, itp. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze typów komórek do swych badań?
3. Czy Doktorantka brała pod uwagę przy opracowywaniu swych modeli QSAR możliwość rozwoju efektu cytostatycznego (hamowanie proliferacji komórek), a może nawet cytotoksycznego (powodującego śmierć komórek), spowodowanego mechanizmami pozakomórkowymi, np. wynikającymi z wiązania się różnych czynników wzrostowych, niezbędnych do rozwoju komórek, do powierzchni nanocząstek (tworzenie korony białkowej), szczególnie po zastosowaniu wysokich



stężeń nanocząstek? W mojej opinii, modelowanie oddziaływań nanocząstek ze składnikami podłoża hodowlanego w układach bezkomórkowych może wnieść wiele cennych informacji o potencjalnych efektach cytotoksycznych.

4. Ze względu na specyfikę badań nanotoksykologicznych postuluje się aby stężenia nanocząstek wyrażać nie tylko w jednostkach masowych (np. $\mu\text{g/ml}$), ale także innych np. w postaci masy lub liczby nanocząstek w przeliczeniu na cm^2 naczynia hodowlanego. Czy Doktorantka podejmowała próby opracowania swych modeli QSAR stosując jednostki metryczne dla EC50, inne aniżeli masowe?

Przy tak skomplikowanym opracowaniu jakie przygotowała Doktorantka, niezwykle trudno jest ustrzec się pewnych błędów w tekście. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej takie błędy, które napotkałem podczas lektury rozprawy:

- strona 30, Figure 3. Example of TiO_2 labeling – rysunek błędnie przedstawia Ti_2O zamiast TiO_2 ;
- strona 44, numeracja rysunków wydaje się nieprawidłowa (jest: Figure 6., powinno być: Figure 11.);
- strona 25544 w oryginalnej publikacji *J. Phys. Chem. C 2015* – równanie nr 2 i 3 jest nieprawidłowe;
- strona 13988 w oryginalnej publikacji *Nanoscale 2014* – Figure 1. jest: example of TiO_2 , powinno być: example of Al_2O_3 ;
- strona 13991 w oryginalnej publikacji *Nanoscale 2014* – pierwszy akapit od góry – wielkość komórek podana jest błędnie w nm, zamiast w μm .

Wyżej wymienione uwagi i niedociągnięcia w żaden sposób nie przesłaniają znaczącej wartości naukowej rozprawy oraz znakomitego przygotowania Doktorantki. Podsumowując przedłożoną rozprawę stwierdzam, że Autorka uzyskała niezwykle ciekawe i użyteczne wyniki, które z całą pewnością zostaną wykorzystane przy doskonaleniu modeli nano-QSAR. Może to mieć nie tylko wartości naukowo-poznawcze (w kategorii poznawania mechanizmów toksyczności nanocząstek), ale także bardziej wymierne, finansowe (zastępowanie układów badawczych *in vivo*, szybszymi i tańszymi metodami *in silico*). W realizacji swych prac Doktorantka, poza rozległą wiedzą z zakresu chemii obliczeniowej, wykazała się dużą biegłością w posługiwaniu się specjalistycznym oprogramowaniem komputerowym do QSAR oraz znajomością metod statystycznych. Analiza dotychczasowej kariery oraz dorobku publikacyjnego Doktorantki dodatkowo potwierdza Jej znakomity warsztat naukowy i uzasadniania Jej starania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Natalii Syzochenko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką jakość i nowatorski charakter badań Doktorantki wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej.

Mewy Skpawcz