



Gdański Uniwersytet Medyczny
KATEDRA BIOFARMACJI
I FARMAKODYNAMIKI

Medical University of Gdańsk
DEPARTMENT OF BIOPHARMACEUTICS
AND PHARMACODYNAMICS

Prof. dr hab. Roman Kaliszan, czł. koresp. PAN i PAU

tel. (48)(58) 3493260 fax: (48)(58) 3493262

ul. Gen. J. Hallera 107, PL 80-416 Gdańsk

e-mail: roman.kaliszan@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2013-04-19

Recenzja

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

Toksykologia obliczeniowa wywodzi się z chemometrii. Chemometria, z kolei, to dziedzina chemii, która rozwinęła się w ostatnim trzdziestoleciu XX wieku dzięki wprowadzeniu do pracowni naukowych komputerów i zaimplementowaniu paradygmatów psychometrii, socjometrii i ekonometrii, sformułowanych w pierwszym ćwierćwieczu minionego wieku. Statystyczne metody przetwarzania danych, rozpropagowane przez chemometrię, umożliwiają „wyłuskanie” z licznych i złożonych zbiorów zmiennych systemowej informacji o substancjach chemicznych i skutkach ich interakcji z otoczeniem. Obecnie metody i procedury chemometryczne są często rutynowo (na zasadzie tzw. „czarnej skrzynki”) wykorzystywane przy opracowywaniu danych eksperymentalnych w celu mniej czy bardziej wiarygodnej predykcji właściwości fizykochemicznych i biologicznych istniejących bądź wirtualnych substancji. Rzetelna wiedza i zaawansowany warsztat badawczy z zakresu chemometrii, w połączeniu z naukowym krytycyzmem, mogą być także bardzo przydatne do interpretacji sensu fizycznego uzyskanych wyników i do racjonalnego projektowania dalszych badań. Taka nowoczesna chemometria, zastosowania w toksykologii obliczeniowej dotyczącej nanomateriałów, jest przedmiotem pracy doktorskiej mgr Agnieszki Gajewicz.

Oceniana praca doktorska, poza rozwiązaniem konkretnego toksykologiczno-środowiskowego celu aplikacyjnego, czyli poza zbudowaniem modeli umożliwiających przewidywanie cytotoksyczności względem komórek bakterii *E. coli* i linii komórkowych ludzkich keratynocytów HaCaT, podejmuje też oryginalne kwestie metodyczne w zakresie modelowania molekularnego fragmentów powierzchni nanocząstek tlenków metali i metaloidów.



DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 23.04.2013

L.dz. 8010-WCH/IP-669/13

Pracę doktorską mgr Agnieszki Gajewicz cechuje oryginalność naukowa i wybitna aktualność nanotechnologicznej tematyki badawczej. Autorka wykazała, że za pomocą deskryptorów struktury, wyznaczonych metodami chemii obliczeniowej i analizy obrazu mikroskopowego, można zróżnicować właściwości fizykochemiczne nanocząstek tlenków nieorganicznych. Do realizacji tego celu zastosowała metodykę budowy uproszczonych modeli molekularnych fragmentów powierzchni analizowanych nanocząstek. Wybór tych fragmentów nie był arbitralny, lecz wynikał z przeprowadzonych badań wpływu wielkości fragmentu molekularnego na wyniki obliczeń kwantowo-mechanicznych. Przyznam jednak, że nie mam jasności, czy budowane układy molekularne były determinowane przez rozmiary krystalograficznych komórek elementarnych (Tabela 6), czy miały wielkość $5 \times 5 \times 5 \text{ \AA}^3$ (str. 61, 159), czy wielkość ta wynosiła $12 \times 12 \times 12 \text{ \AA}^3$ (str. 58, 91). Dopiero w ostatnim przypadku osiągnięte byłoby pogranicze skali „nano”.

Dla rozważanych fragmentów molekularnych Autorka wyznaczyła standardowe deskryptory kwantowo-chemiczne. Są one wymienione w Tabeli 4 z dość zastanawiającymi odnośnikami literaturowymi: przykładowo, fundamentalnemu w chemii kwantowej parametrowi E_{HOMO} przypisana została pozycja literaturowa nr 114 z 2007 roku.

Oryginalnym elementem pracy doktorskiej są deskryptory nanostruktury oparte o fotograficzną rejestrację obrazu z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), zestawione w Tabeli 14. Pozwolę sobie jednak zauważyć, że niektóre z 11 zaproponowanych deskryptorów stanowią proste algebraiczne przekształcenia innych, np. $d_s = (A/\pi)^{1/2}$, i nie wnoszą niezależnej informacji strukturalnej. Pomysł wykorzystania obrazów z TEM był jednak interesujący i szkoda, że nie zaowocował wartościowym modelem QSAR.

Model QSAR, opisujący za pomocą prostego równania regresji cytotoksyczność badanych tlenków względem *E. coli*, jest najcenniejszym osiągnięciem Doktorantki, uzyskanym w grupie promotora i znakomicie opublikowanym w 2011 roku w *Nature Nanotechnology*. Co prawda, analizując Rysunek 23 można zastanawiać się, czy „Zbiór testowy 1” rzeczywiście potwierdza proponowany model QSAR (Równanie 17). Generalnie jednak, Autorka dostarczyła formalnych argumentów statystycznych na rzecz rozwiniętego w doktoracie modelu. Co więcej, ostro (i słusznie!) skrytykowała konkurencyjny model Toropova i wsp. (publikacja nr 283). Wyrażam uznanie dla naukowej bezkompromisowości Doktorantki, gdyż współautorem skrytykowanej pracy Toropova i wsp. jest promotor: prof. dr hab. Tomasz Puzyn.

Odnosnie parametrów aktywności rozważanych w analizach QSAR sugerowałbym zastąpienie symbolu EC_{50} przez symbol IC_{50} (IC - Inhibitory Concentration). Symbol IC_{50} jest powszechnie używany jako miara cytotoksyczności *in vitro*. W tym miejscu miałbym zapytanie, w jaki sposób zostały wytworzone badane nanocząstki MeOx. Chodzi o zastosowaną metodę

otrzymywania stabilnych nanomateriałów typu MeOx, których przecież nie da się wyprodukować przez rozcieranie w moździerzu. Zwłaszcza, że do porównawczych badań właściwości trzeba zapewnić dla wszystkich próbek podobną wielkość cząstek? Autorka pisze na str. 71, że „Wszystkie nanocząstki charakteryzowały się zbliżoną średnicą”. Chciałbym zapytać, na czym oparte jest to ważne oświadczenie, gdyż toksyczność nanocząstek (IC_{50}) może wynikać zarówno z dystrybucji wielkości cząstek jak z ich natury chemicznej? No i jeszcze jedno pytanie: czy są już przykładowe eksperymentalne wartości cytotoksyczności dla tlenków, dla których przewidziano w dysertacji konkretne wartości IC_{50} z modelu QSAR (Równanie 17)?

Drugi model QSAR, oryginalnie wyprowadzony i wszechstronnie przetestowany w pracy doktorskiej, przedstawia Równanie 25. Opisuje ono zdolność hamowania wzrostu linii komórkowej ludzkich keratynocytów HaCaT w relacji do dwóch deskryptorów kwantowo chemicznych molekularnych fragmentów powierzchni nanocząstki MeOx: entalpii tworzenia nanoklastra i elektryczności Mullikena. Deskryptory te znajdują się wśród wymienionych w Tabeli 5. Odnośnie niektórych mam wątpliwości, czy warto było je wymieniać, gdyż są prostymi przekształceniami arytmetycznymi innych, np. potencjał chemiczny i elektryczność.

Model QSAR (Równanie 25) wydaje się wartościowy. Ciekawe, jaka będzie zgodność przewidywania na jego podstawie IC_{50} względem keratynocytów dla tlenków nieorganicznych, dla których nie ma (jeszcze?) danych eksperymentalnych. Natomiast małą wartość ma model regresji czynników głównych (PCR) – Równanie 26. Nie tylko wartość statystyczna tego modelu jest słaba, jak wykazała Doktorantka. Problemem jest przede wszystkim użycie trzeciego i siódmego czynnika głównego (PC3 i PC7). Przecież te dalekie czynniki dotyczą niewielkiego ułamka zmienności rozważanych danych. Owszem, Autorka podejmuje próby przypisania sensu fizycznego abstrakcyjnym, mało znaczącym czynnikom, ale cała analiza PCR nie wydaje się warta opisu. Wyniki uzyskane metodą PLS są statystycznie lepsze, ale chyba też nie są warte komplikacji i trudności interpretacji uzyskanego modelu.

Interpretacja biochemiczna wyprowadzonych modeli QSAR jest interesująca i dowodzi przygotowania Autorki do podejmowania problematyki toksykologiczno-środowiskowej.

Skrypt do modelowania nano-QSAR jest cennym elementem pracy doktorskiej, chociaż niezbadanych tlenków nieorganicznych, które stanowiłyby realny problem toksykologiczny, pozostało niewiele.

Oceniana praca doktorska zawiera wiele elementów nowości naukowej i dowodzi bardzo dobrego przygotowania mgr Agnieszki Gajewicz do podejmowania największych wyzwań współczesnej chemii i nauk o życiu. Autorka zdobyła już dobre przygotowanie do pracy naukowej w ośrodkach cenionych w skali międzynarodowej, zgromadziła spory dorobek naukowy i uzyskała szereg prestiżowych wyróżnień. Jest niewątpliwie wyróżniającym się

naukowcem najmłodszego pokolenia. Mając na uwadze Jej dalszy rozwój naukowy czuję się zobowiązany zgłosić pewne uwagi krytyczne odnośnie ocenianej dysertacji.

Przede wszystkim praca jest zbyt obszerna: blisko 200 stron (z dodatkami). Część wstępna zajmuje około 50 stron, ale do tego należałoby doliczyć 26 stron w części metodycznej (str. 73-88), które poświęcone są podręcznikowym opisom metod kwantowo-chemicznych i chemometrycznych. Rozdział 2., poświęcony nanomateriałom, sprawia wrażenie napisanego pośpiesznie. Trochę razi mnie używanie w poważnej dysertacji z zakresu nauk ścisłych takich zwrotów, jak „Złota era nanotechnologii” czy „Piękna czy Bestia – bezpieczne czy toksyczne?” Tłumaczone fragmenty piśmiennictwa bywają niezrozumiałe. Na przykład: „Wysoka biogodność nanocząstek magnetycznych polega na promowaniu przeniesienia elektronów między elektrodami a molekułami biologicznymi. Dzięki temu magnetyczne nanocząstki, które charakteryzują się wysoką biokompatybilnością – np. magnetyt (Fe_3O_4) – mogą znaleźć szerokie zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej jako: środki kontrastowe w obrazowaniu magnetyczno-rezonansowym (ang. *Magnetic resonance imaging*, IMR), nośniki leków czy też biosensory do wykrywania określonego rodzaju biomolekuł [34-36]”. Dla ścisłości, z Rysunku 7 odczytałbym, że liczba produktów z nanomateriałami na rynku rosła w okresie 2005-2010 raczej liniowo, niż wykładniczo.

Zastosowana w doktoracie terminologia także budzi niekiedy zastrzeżenia. Na przykład, często stosowane określenie „rezydual”, niepolski zwrot „i/lub”, „unikalne” (unikatowe?), jednostka czasu „godzina” (zamiast „h”), apostrofy po spółgłoskach kończących nazwisko przy ich deklinacji (np. „Hall’a”, „Wadt’a”), dziwne słowo „wskalowanie”, powtórzenia pozycji w spisie literatury (np. nr 142 i 174), nieprecyzyjny opis niektórych użytych skrótów, no i zdarzające się błędy interpunkcji i wydruku. Niektóre błędy zaznaczyłem w otrzymanej do recenzji kopii pracy, którą zamierzam udostępnić Doktorantce.

Podniesione wyżej niedociągnięcia rozprawy doktorskiej mają charakter raczej techniczno-edytorski. Generalnie, praca jest bardzo wartościowa i spełnia ustawowe wymogi stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk chemicznych. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Gajewicz do publicznej obrony tez przedstawianych w ocenianej pracy doktorskiej.

