

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt., „Zmiany strukturalne i funkcjonalne błon erytrocytów człowieka oraz białka modelowego albuminy narażonych na działanie nanocząstek polistyrenu o różnych średnicach (in vitro)”

wykonanej przez mgr Kamila Płuciennika

pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Bukowskiej (promotor) i dr hab. Pauliny Sicińskiej (promotor pomocniczy)

w Katedrze Biofizyki Skazań Środowiska, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego

1

Rozprawa doktorska mgr Kamila Płuciennika została napisana w postaci wielostronicowego komentarza (Wprowadzenia) do zbioru 3 artykułów opublikowanych w latach 2023 – 2025 w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym oraz jednego manuskryptu publikacji oryginalnej (wysłany do czasopisma *Nanotoxicology*, 2025). Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich pracach włączonych do rozprawy doktorskiej (2 prace oryginalne, jedna publikacja przeglądowa, manuskrypt publikacji), co definiuje Jego kluczowy wkład w ich powstanie. Sumaryczna wartość 5-letniego IF prezentowanych prac wynosi 13,4, sumaryczna punktacja MNiSW wynosi 380. Praca obejmuje 32 strony maszynopisu, włączając w to streszczenie, literaturę uzupełniającą (37 pozycji bibliografii i 2 źródła internetowe), a także listę własnego dorobku naukowego.

W skład dorobku naukowego mgr Kamila Płuciennika wchodzi współautorstwo 3 publikacji w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Doktorant jest współautorem 3 doniesień konferencyjnych w języku angielskim i 5 doniesień konferencyjnych w języku polskim, w tym jedna prezentacja ustna. Ponadto Doktorant był organizatorem i członkiem komitetu naukowego na konferencjach, prowadził warsztaty popularyzujące naukę organizowane przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Doktorant uczestniczył w szkoleniach naukowych i odbył staż naukowy na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie, oraz jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biofizycznego.

Piśmiennictwo zacytowane w pracy, zarówno we Wprowadzeniu jak i w publikacjach włączonych do rozprawy, obejmuje dobrze dobrane tematycznie źródła, głównie publikacje z czasopism naukowych opublikowane, w przeważającej liczbie, w ostatnich 5 latach. Zarówno we Wprowadzeniu jak i w publikacjach włączonych do rozprawy występują przejrzyste i bardzo czytelne schematy i ryciny, które uzupełniają test pracy.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamila Płuciennika dotyczy oceny wpływu nanocząstek polistyrenu (PS-NPs) na strukturę i funkcjonowanie albuminy ludzkiej oraz erytrocytów. Cele szczegółowe pracy dotyczyły:

1. analizy wpływu PS-NPs na indukcję hemolizy w zawiesinie erytrocytów,
2. określenia oddziaływania PS-NPs na płynność błony erytrocytarnej oraz na morfologię komórek,

3. oceny zmian powodowanych przez nanocząstki polistyrenu w wybranych białkach erytrocytarnych oraz albuminie ludzkiej, w tym: analiza poziomu utleniania białek błonowych i hemoglobiny, zmiany w aktywności acetylocholinoesterazy, a także zaburzenia w strukturze przestrzennej oraz utlenianiu tryptofanu w albuminie,

4. zbadania wpływu PS-NPs na proces eryptozy oraz określenie mechanizmu tego procesu.

W badaniach zastosowano niefunkcjonalizowane nanocząstki polistyrenu o różnych średnicach (~30 nm, ~45 nm i ~70 nm) i w szerokim zakresie stężeń (0,001 – 200 µg/ml) w zależności od stosowanej metody.

Problematyka pracy jest nowatorska, a uzyskane wyniki dobrze uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat oddziaływania cząstek plastiku na składniki krwi w organizmie człowieka. Na podstawie literatury naukowej wiadomo, że nanocząstki plastiku wykrywano we krwi czy innych tkankach człowieka. Badania opisane w pracy odnoszą się zarówno do komórek – erytrocytów (krwinek czerwonych), najbardziej licznych komórek krwi, jak i do białek erytrocytów i albuminy ludzkiej, białka najobficiej występującego w osoczu krwi. Takie podejście, oparte o równoczesną analizę wpływu PS-NPs na albuminę i erytrocyty pozwala na zidentyfikowanie wspólnych mechanizmów toksyczności na różnych poziomach złożoności biologicznej i prowadzi do wniosków, że PS-NPs mogą uszkadzać erytrocyty nie tylko bezpośrednio, ale także pośrednio poprzez modyfikację albuminy, co odbiera krwinkom ich naturalną barierę ochronną.

Znaczącym elementem nowatorskim jest wykazanie, że istotne zmiany strukturalne w albuminie (zmiana otoczenia tyrozyny i tryptofanu w cząsteczce) oraz zmiany funkcjonalne w erytrocytach (usztynwienie błony komórkowej, modyfikacja lepkości wewnątrzkomórkowej, zmiany kształtu komórek) zachodzą już przy bardzo niskich stężeniach PS-NPs (0,1–10 µg/ml). Większość wcześniejszych badań koncentrowała się na znacznie wyższych dawkach, które są mało prawdopodobne do wystąpienia w warunkach *in vivo*. Wyniki te mają więc kluczowe znaczenie dla realnej oceny ryzyka zdrowotnego u ludzi.

Ważnym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest wskazanie, w jaki sposób cząstki plastiku mogą wywoływać śmierć erytrocytów. Wykazano, że PS-NPs w stężeniach przedhemolitycznych (poniżej 10 µg/ml) nie indukują klasycznej eryptozy (zaprogramowanej śmierci krwinek); nie zaobserwowano zmian stężenia wapnia w komórkach, zmian w eksternalizacji fosfatydyloseryny ani aktywacji kaspazy-3, a także wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w stężeniach, które nie niszczą błony komórkowej. Zamiast tego odkryto, że plastik wywołuje wzrost aktywności kalpain co objawia się zmianami w strukturze błony i cytoszkieletu erytrocytów prawdopodobnie o charakterze mechanicznym.

Kolejną ważną obserwacją wynikającą z przeprowadzonych przez Doktoranta badań jest wykazanie tworzenia tzw. „twardej korony” (*hard corona*) na niefunkcjonalizowanych PS-NPs poprzez oddziaływanie z albuminą. Wykazano, że oddziaływanie to prowadzi do trwałych zmian w strukturze drugorzędowej albuminy, co powoduje spadek właściwości ochronnych czy nasilenie procesu hemolizy. Zaobserwowano, że większe nanocząstki (~70 nm) tworzą mierzalną metodą dynamicznego rozpraszania światła "twardą" koronę białkową z albuminą, podczas gdy dla najmniejszych cząstek (~30 nm) efekt ten był poniżej granicy wykrywalności.

W badaniach wykazano zależność pomiędzy efektami biologicznymi a stężeniem nanocząstek oraz potwierdzono wpływ wielkości nanocząstek. Najmniejsze cząstki (~30 nm) okazały się

najbardziej hemolityczne, co przypisuje się ich łatwiejszej penetracji i gęstszemu upakowaniu na błonie. Największe cząstki (~70 nm) wykazują największą zdolność do zmiany kształtu krwinek (tworzenie stomatocytów) przy najniższych stężeniach, co wynika z silniejszego nacisku fizycznego na powierzchnię komórki. Ponadto, w pracy podkreślone jest znaczenie pomiaru potencjału zeta w konkretnym medium inkubacyjnym (bufor Ringera pH=7,4), a nie tylko w wodzie, co pokazuje, jak środowisko biologiczne zmienia właściwości fizykochemiczne nanocząstek plastiku i ich zdolność do adhezji do komórek.

Do zrealizowania celów pracy w badaniach zastosowano kilka metod, w tym metody fluorymetryczne i spektrofotometryczne, metodę elektronowego rezonansu paramagnetycznego, cytometrię przepływową, określenie potencjału zeta, dychroizm kołowy, metodę dynamicznego rozpraszania światła, mikroskopię świetlną. Do analizy statystycznej wyników zastosowano test ANOVA, i test post hoc Tukey'a, oceniono spełnienie warunków do takiej analizy (zgodność z rozkładem normalnym, homogenność wariancji). Wszystkie metody zostały szczegółowo opisane we Wprowadzeniu oraz w załączonych publikacjach. W mojej opinii metody zostały prawidłowo dobrane do zrealizowania postawionych celów pracy.

Opisane w pracy wyniki badań są właściwie omówione w porównaniu do danych opisanych w literaturze naukowej. Dotyczy to szczególnie rozdziału Dyskusja w publikacjach włączonych do pracy, gdzie wyniki pracy własnej są przedyskutowane ze wskazaniem różnic i podobieństw z wynikami raportowanymi przez innych badaczy, z podkreśleniem nowatorstwa i uzasadnieniem badań własnych. Wszystkie postawione cele pracy zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie odpowiednich wniosków (wnioski są poparte wynikami badań opisanymi w pracy). Doktorant wskazuje na znaczenie modyfikacji struktury albuminy pod wpływem PS-NPs, co może pośrednio nasilać uszkodzenia erytrocytów wywołane przez nanoplastik w organizmie (in vivo). Zmiany w cząsteczce albuminy mogą prowadzić do denaturacji tego białka i w konsekwencji do destabilizacji błony komórkowej erytrocytów.

Z obowiązku recenzenta chciałabym zwrócić uwagę na kilka punktów:

- materiałem badawczym są erytrocyty izolowane z kożuszków leukocytarnych separowanych z krwi ludzkiej. Dlaczego taki wybór materiału do uzyskania erytrocytów zamiast krwi pełnej? W kożuszkach są głównie leukocyty i płytki krwi, które mogą także pozostać w zawiesinie erytrocytów przygotowanej do badań.
- dlaczego wybrano 24-godzinny czas inkubacji badanych cząstek polistyrenu z komórkami czy białkami? W literaturze opisywane są badania z krótszą inkubacją np. 3 godziny.

Uwagi do manuskryptu publikacji do Nanotoxicology:

- w badaniu nie wykazano istotnego wpływu PS-NPs na eksternalizację fosfatydyloseryny na powierzchni erytrocytów poza najwyższym stężeniem najmniejszych badanych nanocząstek (30 nm). Do oceny ekspozycji fosfatydyloseryny zastosowano metodę wiązania aneksyny V, która wymaga wyższych stężeń jonów Ca (np. 2,5 – 3 mM) w oddziaływaniu z komórkami, natomiast w buforze Ringera stężenie Ca²⁺ wynosi 1 mM. Czy w tej metodzie poprzestano na 1 mM stężeniu Ca²⁺?

- w badaniu zastosowano metodę cytometrii przepływowej, brakuje informacji jakie parametry rejestrowano (odsetek komórek pozytywnych? mediana intensywności fluorescencji?)
 - w jakim buforze były wykonywane pomiary stężenia jonów wapnia? HBSS? Bufor HEPES? O jakim składzie?
 - zabrakło w tekście Wprowadzenia wyjaśnienia skrótów z języka angielskiego np. HSA, ROS.
- Przedstawione powyższej uwagi nie umniejszają dobrej oceny merytorycznej pracy.

4

W mojej opinii praca przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wpisuje się w bardzo aktualną problematykę wpływu środowiska oraz stylu życia na zdrowie człowieka. W ostatnich latach znacząco zwiększyła się ilość plastiku w otoczeniu człowieka, znacząco też wzrosła ilość produktów jego rozpadu, które w postaci mikrocząstek czy nanocząstek o zróżnicowanej wielkości i składzie (np. cząstki zawierające funkcjonalne grupy chemiczne nadające ładunek) wnikają do organizmu człowieka lub zwierząt i kumulują się w tkankach. Badania nad wpływem nanocząstek plastiku na tkanki organizmu człowieka mają istotne znaczenie z perspektywy współczesnych nauk biomedycznych, toksykologii środowiskowej oraz zdrowia publicznego. Wyniki opisane w pracy przybliżają mechanizmy wzajemnych oddziaływań pomiędzy cząstkami plastiku a komórkami krwi - erytrocytami czy białkami, wskazują na oddziaływania z błonami komórkowymi, umożliwiają identyfikację potencjalnych mechanizmów toksyczności, takich jak stres oksydacyjny czy zaburzenia funkcji komórkowych. Ocena roli cząstek plastiku wobec tkanek, komórek czy białek ma znaczenie dla oceny długoterminowego ryzyka zdrowotnego związanego z ekspozycją na mikro- i nanoplastik. Systematyczne badania pozwalają ustalić, czy ich obecność może przyczyniać się do rozwoju chorób przewlekłych, zaburzeń immunologicznych lub procesów nowotworowych. Obserwacje poczynione w pracy zwracają także uwagę na zachowanie cząstek w różnym środowisku, w tym na zmiany ładunku cząstek w buforach w porównaniu do wody, co może przyczyniać się do rozwoju metod diagnostycznych i analitycznych umożliwiających wykrywanie i ilościową analizę nanoplastików w tkankach biologicznych.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami współautorów, udział Doktoranta w publikacjach włączonych do pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu eksperymentów, analizie, opracowaniu i interpretacji wyników, opracowaniu pierwszej wersji manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów i zatwierdzeniu ostatecznej wersji pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska magistra Kamila Płuciennika jest nowatorska i wnosi wartości poznawcze uzupełniające dotychczasową wiedzę na temat wpływu niefunkcjonalizowanych nanocząstek polistyrenu na erytrocyty i białka osocza. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Przedkładam Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne wniosek o dopuszczenie mgr. Kamila Płuciennika do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Łódź, 10 marca 2026 roku