



Prof. dr hab. Aleksander Bilewicz
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16; 03-195 Warszawa
Tel.: (+48.22)504 13 57
Fax: (+48.22)811.15.32
E-mail: a.bilewicz@ichtj.waw.pl

Warszawa 05.02.2024

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Jasminy Bałaban „Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe” wykonanej w Instytucie Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg.

Obecnie obserwuje się dynamiczny rozwój nanotechnologii, która wykorzystuje nanostruktury w różnych obszarach działalności człowieka, głównie w medycynie. Między innymi bardzo ważne są zastosowania nanostruktur jako nośników substancji aktywnych biologicznie, które dostarczają je do chorobowo zmienionych tkanek organizmu. Jednym z pierwszych komercyjnie dostępnych leków opartych na nanocząstkach był Doxil, czyli doksorubicyna liposomalna, powszechnie stosowana w leczeniu raka. Nowym odkryciem mogącym znaleźć zastosowanie medyczne jest także grafen, płaska struktura złożona z atomów węgla. Czysty grafen cechuje się dużą hydrofobowością, jednak defekty na jego powierzchni umożliwiają liczne modyfikacje chemiczne. Można wprowadzać różne grupy funkcyjne, zawierające atomy tlenu, tworząc wiązania kowalencyjne. Istnieją także inne metody modyfikacji, oparte na oddziaływaniach van der Waalsa, wiązaniach wodorowych, czy oddziaływaniach warstwowych typu π - π .

Łatwo zsyntezowany może być także tlenek grafenu (GO), który będąc pochodną grafenu, podobnie jak on zbudowany jest z węglowych pierścieni heksagonalnych. Wskutek utleniania posiada w swojej strukturze wiele grup funkcyjnych takich jak grupy hydroksylowe, epoksydowe oraz karboksylowe i karbonylowe, które zlokalizowane są głównie na jego krawędziach.

Tlenek grafenu, z uwagi na swą wysoką reaktywność a także hydrofilowość pozwalającą na dyspersję w roztworach wodnych oraz szerokie możliwości funkcjonalizacji skupia uwagę przede wszystkim jako potencjalny nośnik kontrastów diagnostycznych, a szczególnie środków terapeutycznych. Dotychczas w literaturze przedstawiono szereg układów

nośnik grafenowy-lek. Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że tlenek grafenu może skutecznie w dostarczać leki przeciwnowotworowe, takie jak doksorubicyna, analogi komptotecyny oraz trudno rozpuszczalne antybiotyki, przeciwciała monoklonalne, peptydy a także fragmenty DNA lub RNA. Duża powierzchnia aktywna grafenu sprawia, że może być skutecznie wykorzystywany w tzw. terapii skojarzonej, polegającej na jednoczesnym podawaniu dwóch lub więcej środków farmakologicznych. GO badany jest także w radiofarmacji jako jednoczesna platforma dla radionuklidów, chemoterapeutyków i wektorów celujących.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska właśnie dotyczy trzech zagadnień biologicznych, które łączy zastosowanie tlenku grafenu. Obok stosowanego GO łączy te wszystkie publikacje także obiekt badań jakim są mięśnie szkieletowe. Stosowano go jako niszy do wzrostu i różnicowania komórek mięśniowych, jako składnik kompleksu z ekstraktem białkowym do badania wzrostu mięśni zarodków brojlerów oraz jako materiał koloidalny wiążący białka prozapalne.

Praca ma układ trzech oryginalnych publikacji poprzedzonych 37-stronicowym wstępem. We wszystkich trzech pracach mgr inż. Jasmina Bałaban jest pierwszą autorką i zostały one opublikowane w dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Sumaryczny Współczynnik Oddziaływania czasopism wynosił 12,5. Udział mgr inż. Bałaban we wszystkich publikacjach był dominujący, obejmujący zarówno projektowanie eksperymentów, ich realizację, interpretację wyników, jak i pisanie publikacji. W załączonych oświadczeniach współautorzy wskazali jedynie na swój paru procentowy udział w tych publikacjach. W mojej opinii udział 2% współautorów jest jednak zaniżony. Jeden ze współautorów napisał nawet że jego udział polegał jedynie na udostępnieniu aparatury. Taka usługa powinna być jednak zaznaczona tylko w podziękowaniach.

Warto także dodać, że jak znalazłem w bazie Web of Science, mgr inż. Jasmina Bałaban jest współautorką w sumie 13 publikacji, co jak na doktoranta jest wynikiem bardzo dobrym.

We wstępie autorka zamieściła na początku część dotyczącą podstawowych informacji fizyko-chemicznych dotyczących grafenu oraz tlenku grafenu. W mojej opinii ten wstęp mógłby być rozszerzony o unikalne własności grafenu związane z występowaniem monowarstwy, a także opisem metod otrzymywania GO. Warto byłoby jeszcze dodać informację o szerokich zastosowaniach GO w medycynie.

W dalszej części wstępu autorka opisała zagadnienia biologiczne w których próbowała zastosować GO. Były to bardzo istotne problemy biologiczne zarówno z punktu widzenia naukowego jak i aplikacyjnego. Dotyczyły one różnych badań dotyczących mięśni

szkieletowych. W badaniach przeprowadzonych w przedstawionej pracy wykorzystano komórki prekursorowe mięśni z zarodków kury, ekstrakt z mięśni zarodka kury zawierający mieszanekę czynników wzrostu, oraz próbki tlenku grafenu.

W załączonej pracy nr.1 zatytułowanej „Effects of Graphene Oxide Nanofilm and Chicken Embryo Muscle Extract on Muscle Progenitor Cell Differentiation and Contraction” autorka z współpracownikami zbadała wpływ ekstraktu z mięśni 18 dniowego zarodka kury oraz nanofilmu GO dodanego do hodowli prekursorowych komórek mięśni zarodka kury. Celem badań było określenie wpływu tych dodatków na proces różnicowania i tworzenia tkanki mięśniowej. GO zastosowano jako modyfikację powierzchni do wzrostu i różnicowania komórek prekursorowych. Obserwacja morfologii komórek pokazała, że proces różnicowania komórek został zainicjowany poprzez dodatek CEME pobranego w 18 dniu rozwoju zarodkowego. Przeprowadzono bardzo ciekawą analizę ekstraktu wybierając białka odpowiadające za skurcze mięśniowe. Wybrano je poprzez porównanie z białkami z ekstraktu wątroby, dla których nie obserwowano tego efektu. Białka te zestawiono w tabeli. Może warto byłoby dodać obok masy cząsteczkowej także oszacowaną zawartość poszczególnych białek. Na podkreślenie zasługuje fakt, że zaobserwowano po raz pierwszy spontaniczne skurcze mięśniowe w warunkach *in-vitro*. Tak więc dodatek CEME w stężeniu około 1% pożywki hodowlanej może umożliwić wyhodowanie mięśni pseudotkankowych zdolnych do samoistnego skurczu.

W badaniach nie stwierdzono jednak żadnego istotnego wpływu nanofilmu GO na stymulację różnicowania mięśniowych komórek prekursorowych. Nie zauważono także jego negatywnego wpływu na żywotność komórek.

W załączonej pracy nr 2, zatytułowanej „Effect of Muscle Extract and Graphene Oxide on Muscle Structure of Chicken Embryos”, badano wpływ CEME i jego kompleksu z GO, na wzrost i rozwój mięśni kończyn tylnych zarodka kurzego. W pierwszej kolejności przeprowadzono wstępne badanie *in-vitro* pierwotnej hodowli komórek prekursorowych mięśni uzyskanych z dziewięciodniowego zarodka kurczaka w celu oceny toksyczności. Następnie przeprowadzono badania na zarodkach kurzych, używając ekstraktu CEME, GO i ich koniugatu wstrzykniętych *in-ovo*. Nie zaobserwowano negatywnego wpływu na śmiertelność, masę ciała i biochemię krwi po zastosowaniu zarówno CEME jak i kompleksu GO-CEME. Zaobserwowany jedynie nieznaczny efekt obniżenia aktywności metabolicznej komórek po podaniu 10% koniugatu CEME + GO. Autorka tłumaczy to aktywnością grup tlenowych na powierzchni GO i generowaniem wolnym rodników. Nie wydaje się jednak możliwe aby grupy hydroksylowe, karboksylowe, czy karbonyłowe mogły generować

reaktywne rodniki. Raczej to jest związane, jak podaje literatura, z generacją ROS przez promieniowanie NIR, czy widzialne. Analiza próbek pokazała na wzrost liczby komórek w grupach z ekstraktem w stężeniu 2% i 5%. Wynik ten się jednak nie potwierdził dla próbki z 5% CEME w przypadku liczenia liczby jąder a także w przypadku współczynnika proliferacji, gdzie nie obserwowano istotnych różnic w stosunku do próbki kontrolnej. Myślę, że autorka spróbuje wyjaśnić te rozbieżności w trakcie obrony.

W badaniach *in-ovo* zauważalny był pozytywny wpływ ekstraktu o stężeniu 2% na rozwój mięśni zarodków. Niestety, zarówno w badaniach *in-vitro*, jak i *in-ovo*, nie zaobserwowano istotnego wpływu dodatku GO do ekstraktu. Szkoda, że w ramach tych badań nie przeprowadzono analizy stopnia skompleksowania białek CEME przez GO oraz nie zbadano, czy następuje uwolnienie białek z GO w warunkach doświadczeń *in-vitro* i *in-ovo*.

Otrzymane wyniki badań mogą mieć istotne znaczenie aplikacyjne, sugerując, że CEME może być skutecznym środkiem wzmacniającym rozwój mięśni u brojlerów. Oczywiście, aby to potwierdzić, konieczne jest przeprowadzenie dalszych, szczegółowych badań.

W publikacji nr 3 "Graphene Oxide Decreases Pro-Inflammatory Proteins Production in Skeletal Muscle Cells Exposed to SARS-CoV-2 Spike Protein" autorka wykazała obecność receptora ACE2 w prawidłowych komórkach mięśni szkieletowych człowieka. Udokumentowała również w przeprowadzonych doświadczeniach, że białko szczytowe wirusa SARS-CoV-2 wpływa na aktywację wybranych białek prozapalnych, które promują burzę cytokin i stres oksydacyjny w komórkach mięśniowych. Jest to obserwacja o kluczowym znaczeniu, gdyż mięśnie stanowią około 40% masy ciała człowieka, co może wiązać się z istotnymi konsekwencjami zdrowotnymi w przypadku zakażenia wirusem SARS-CoV-2. W swoich badaniach doktorantka skupiła się na badaniach możliwości zastosowania płatków GO do wiązania białek prozapalnych generujących burzę cytokinową. Po dodaniu płatków tlenku grafenu do hodowli *in-vitro* komórek mięśniowych inkubowanych w obecności białka S kolca wirusa SARS-CoV-2 doktorantka zaobserwowała zmniejszenie poziomu 431 białek w tym związanych ze stanem zapalnym generowanym z obecnością białka S. Poziom białek prozapalnych był porównywalny z grupą kontrolną. Można przypuszczać, że GO może wspomagać terapię przeciwzapalną w mięśniach poprzez wychwytywanie białek aktywujących burzę cytokin. Niestety proces adsorpcji białek na płatkach GO nie był selektywny. Trzeba także pamiętać, że po ewentualnym dodaniu do organizmu GO natychmiast pokryłby się on koroną białkową i straciłby zdolność adsorpcji białek prozapalnych. Myślę, że przydatne byłyby w przyszłości badania wielkości adsorpcji białek na GO w zależności od ich typu,

budowy czy masy oraz od modyfikacji próbek GO. Może można by się wtedy pokusić się na bardziej selektywną adsorpcję konkretnych białek.

Przedstawiona do recenzji praca zawiera bardzo dużą ilość materiału eksperymentalnego. Przeprowadzono szereg pracochłonnych badań *in-vitro* i *in-ovo* uzyskując szereg ważnych wyników. Ponieważ wszystkie wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w dobrych czasopismach poprawność stosowanej metodyki badań została już zweryfikowana przez recenzentów tych publikacji.

W podsumowaniu stwierdzam, że tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Jasminy Bałaban z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego jest bardzo aktualna i nowatorska. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością dziedziny, której dotyczy praca. Trzeba także podkreślić, że praca jest napisana bardzo starannie, zrozumiale, dobrym i jasnym językiem. Nie znalazłem w zasadzie żadnych błędów językowych.

Wobec powyższego stwierdzam, że oceniana praca doktorska mgr inż. Jasminy Bałaban „Wpływ tlenku grafenu i wybranych białek na funkcjonalno-morfologiczne cechy komórek mięśniowych. Badania modelowe” w pełni spełnia kryteria dla rozpraw doktorskich określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) i z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o dopuszczenie mgr inż. Jasminy Bałaban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się z propozycją wyróżnienia rozprawy ze względu na jej innowacyjny charakter, otrzymanie bardzo wartościowych wyników i w perspektywie możliwość zastosowania uzyskanych wyników w hodowli drobiu.

A. Miłunia

Helsander Bielen
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
03-195 Warszawa, Dorodna 16.

INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ
03-195 Warszawa, ul. Dorodna 16
tel. (22) 504-... fax. (22) 8...
NIP: 525-000-83-30



Prof dr hab. Agnieszka Gniadowska - Pietkowska
✓ Instytut Biologii SGGW w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159
02-476 Warszawa
(Recenzje pracy doktorskiej)

R

(00)159007734809684144

(00)159007734809684144

Poczta Polska
Opłata pobrana H zł 30 gr

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2024-03-01
WPEŁNIŁO DATA 3-


RPM/5636/2024 N
Data: 2024-03-01