

Warszawa, 09 listopada 2021 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Centrum Radiobiologii i Dozymetrii Biologicznej
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
ul. Dorodna 16
03-195 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Malwiny Sosnowskiej

pt.: Nanocząstki alotropowych form węgla jako potencjalne komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej modulujące transdukcję sygnału w komórkach nowotworowych wątroby

Recenzja została wykonana w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowską-Piekarską, z dnia 28 września 2021 roku, w związku z decyzją Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, na mocy której zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Malwiny Sosnowskiej.

Rozprawa doktorska mgr Malwiny Sosnowskiej została przygotowana w Katedrze Nanobiotechnologii w Instytucie Biologii Szkoły Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Sawosz Chwalibóg (promotor) oraz dr Marty Kutwin (promotor pomocniczy). Rozprawa została przedstawiona w formie 48-stronicowego dzieła, obejmującego streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wykaz skrótów, wstęp, hipotezę badawczą, cel i zakres pracy, metodykę badań, omówienie głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń, podsumowanie, wnioski, bibliografię, zestaw 3 publikacji, wchodzących w skład rozprawy oraz oświadczenia współautorów. Prace te są spójne tematycznie i zostały opublikowane w latach 2019–2021 w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports/Web of Science [International Journal of Nanomedicine (IF5 = 5.1, 140 pkt), Cancer Nanotechnology (IF5= 6.0, 100 pkt) oraz Nanotechnology, Science and Applications (IF5= 9.5, 200 pkt)]. Można zatem uznać, że najbardziej istotna część rozprawy została już raz wstępnie zweryfikowana. Wszystkie publikacje są publikacjami wieloautorskimi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Wkład pracy współautorów oraz Doktorantki w powstanie publikacji został udokumentowany w stosownych oświadczeniach. Nie ma wątpliwości, że Doktorantka była głównym autorem koncepcji badań przedstawionych w pracy 2 i 3, autorem koncepcji i wykonawcą bardzo znacznej części badań eksperymentalnych we wszystkich 3 pracach oraz opracowania, analizy i interpretacji

uzyskanych wyników. Bezdyskusyjny jest również udział Doktorantki w przygotowaniu i redakcji manuskryptów oraz pozyskiwaniu finansowania na badania.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej było poznanie wpływu nanofilmu z wybranych nanocząstek węglowych, jako potencjalnej biomimicznej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), na transdukcję sygnału mechanicznego i chemicznego w nowotworowych i prawidłowych komórkach wątroby. Problem jest bardzo ciekawy z poznawczego punktu widzenia, ponieważ pomimo dotychczasowych badań nad opracowaniem biomimicznej macierzy zewnątrzkomórkowej, uzyskane rezultaty nadal nie są zadowalające. Problem ten jest również bardzo interesujący z punktu widzenia praktycznego wykorzystania uzyskanej wiedzy do opracowania w przyszłości nowych strategii terapeutycznych.

Punktem wyjścia do badań była pilna potrzeba znalezienia materiału, który będzie zdolny do zastąpienia zdegradowanej macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) w poresekcyjnej niszy guza wątroby w celu pobudzania mechanizmów jej regeneracji. Kluczową strategią tworzenia sztucznej macierzy zewnątrzkomórkowej jest rekonstrukcja właściwości fizyko-chemicznych i mechanicznych zdrowej tkanki. Doktorantka przedstawiła we wstępie do rozprawy zalety stosowania syntetycznych powłok powierzchniowych i omówiła cechy idealnego biomateriału podtrzymującego zdegradowaną macierz zewnątrzkomórkową. Mój pewien niedosyt budzi brak informacji o dotychczasowych badaniach nad syntetycznymi powłokami powierzchniowymi. W dalszej części rozprawy Doktorantka zaprezentowała wyniki badań naukowych, które wskazują na ewentualną możliwość wykorzystania nanomateriałów węglowych jako syntetycznych powłok powierzchniowych. Po pierwsze, rusztowania z nanomateriałów węglowych nie podlegają enzymatycznej degradacji, dzięki czemu mogą przez długi czas pełnić rolę matrycy dla wzrostu i różnicowania komórek, mogą naśladować architekturę zdrowej tkanki i ulegać przebudowaniu odpowiadającemu kinetyce tkanki. Po drugie, wspomniane cechy nanomateriałów węglowych zapewniają łatwe dopasowanie do struktury tkanki, zwiększają adhezję do ECM oraz umożliwią funkcjonalizację materiału innymi molekułami. Ponadto, materiały węglowe nie zakwaszają ECM produktami ich degradacji. W związku z powyższym, jak najbardziej zasadne jest uwzględnienie w badaniach wybranych nanomateriałów węglowych przez Doktorantkę, w celu poznania mechanizmów ich działania.

Doktorantka postawiła sobie trzy zasadnicze cele:

1. określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanofilmu węglowego utworzonego z fulerenów C₆₀ jako mimicznej macierzy, który poprzez optymalizację cech fizyko-chemicznych komórki i zmianę transdukcji sygnału zwiększy adhezję, zahamuje tempo proliferacji oraz doprowadzi do zmian w dystrybucji poszczególnych faz cyklu komórkowego,
2. wyjaśnienie, czy nanofilm z tlenku grafenu nfGO w interakcji z wodnym ekstraktem z wątroby zarodka kury, będący źródłem białek o wielopłaszczyznowej aktywności, zmniejsza potencjał onkogenny komórek

nowotworowych wątroby, normalizując ich zachowanie pod względem adhezji, proliferacji i cyklu komórkowego,

3. zbadanie, czy nanofilm utworzony przez nanocząstki diamentu ND może pełnić rolę aktywatora sygnału mechano-chemo-transdukcji normalizującego ekspresję szerokiego profilu białek wewnątrzkomórkowych, a zwłaszcza zaangażowanych w adhezję, migrację i proliferację, w konsekwencji zmniejszając potencjał onkogenny komórki.

Materiał do badań stanowiły fulereny C60 o wielkość 15-50 nm, płatki tlenku grafenu GO o wymiarach od 100 nm do kilku μm oraz nanocząstki diamentu ND o wielkości od 2 do 13 nm. W doświadczeniach Doktorantka wykorzystwała trzy ludzkie, unieśmiertelnione i adherentne linie komórkowe, w tym jedną linię pochodzącą ze szpiku kostnego o morfologii fibroblastów HS-5 oraz dwie linie nowotworowe wątroby HepG2 i C3A. Doktorantka posłużyła się bardzo wieloma metodami badawczymi, takimi jak metody hodowli komórek *in vitro*, metody mikroskopii (mikroskopia świetlna, transmisyjna mikroskopia elektronowa, skaningowa mikroskopia elektronowa, mikroskopia konfokalna, mikroskopia sił atomowych), metoda DLS pomiaru potencjału zeta, metody spektroskopowe (spektroskopia Ramana, spektroskopia w podczerwieni Fouriera), metoda spektrometrii mas, metody spektrofotometryczne (BrdU, XTT, MTT), test gojenia rany, cytometria przepływowa, Western blot, RT-PCR. Metody te zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań.

Publikacja I - Sosnowska M, Kutwin M, Jaworski S, Strojny B, Wierzbicki M, Szczepaniak J, Łojkowski M, Świążkowski W, Bałaban J, Chwalibog A, Sawosz E. Mechano-signalling, induced by fullerene C60 nanofilms, arrests the cell cycle in the G2/M phase and decreases proliferation of liver cancer cells. International Journal of Nanomedicine. 2019;14:6197.

Celem badań było określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanofilmu węglowego utworzonego z fulerenów C60 jako mimicznej ECM, który poprzez optymalizację cech fizyko-chemicznych komórki i zmianę transdukcji sygnału zwiększy adhezję, zahamuje tempo proliferacji oraz doprowadzi do zmian w dystrybucji poszczególnych faz cyklu komórkowego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały, że koloidy nanocząstek fulerenu C60 tworzyły na dnie naczynia polistyrenowego do prowadzenia kultury komórkowej silnie adhezyjną nanowarstwę (nanofilm), Warstwa ta modyfikowała cechy mechaniczne płytki, a zwłaszcza jej chropowatość. Komórki wszystkich linii komórkowych migrowały preferencyjnie do części płytki pokrytej fulerenami C60 i osadzały się na granicy nanofilm-płytki. Ocena aktywności metabolicznej komórek potwierdziła, że nanofilm C60 był biokompatybilny dla hepatocytów. Wyniki badań wykazały również, że modyfikacja mechanotransdukcji poprzez wprowadzenie do kultury komórkowej nanofilmu C60 wraz z dodatkiem wodnego ekstraktu CELE zwiększyła ekspresję integryny $\alpha 5\beta 1$ i zmniejszyła ekspresję β -kateniny, która odpowiedzialna jest za oddziaływania międzykomórkowe, co w konsekwencji zmniejszyło sztywność macierzy

zewnątrzkomórkowej ECM poprzez redukcję modułu elastyczności komórek. Ostatnim etapem badań było określenie wpływu nanofilmu C60 na proliferację i cykl komórkowy komórek nowotworowych wątroby. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę wykazały, że mechanotransdukcja pochodząca z nanofilmu C60 zwiększyła liczebność populacji komórek nowotworu wątroby linii HepG2 w fazie G2/M cyklu komórkowego i zmniejszyła tempo proliferacji komórek, co zostało potwierdzone zmniejszeniem ekspresji jądrowego antygenu PCNA na poziomie białka. Uzyskane wyniki badań zainspirowały Doktorantkę do podjęcia kolejnych badań nad poszukiwaniem idealnego składnika biomimicznej macierzy w zakresie zarówno jej mechano-aktywnej struktury, jak również potencjalnej kooperacji z kluczowymi dla zdrowej tkanki wątroby białkami.

Publikacja II - Sosnowska M, Kutwin M, Strojny B, Koczón P, Szczepaniak J, Bałaban J, Daniluk K, Jaworski S, Chwalibog A, Bielawski W, Sawosz E. Graphene oxide nanofilm and chicken embryo extract decrease the invasiveness of HepG2 liver cancer cells. *Cancer Nanotechnology*. 2021;12:1-33.

Celem badań było wyjaśnienie czy nanofilm z tlenku grafenu w interakcji z wodnym ekstraktem z wątroby zarodka kury, będący źródłem białek o wielopłaszczyznowej aktywności, zmniejsza potencjał onkogenny komórek nowotworowych wątroby poprzez normalizację ich zachowania pod względem adhezji, proliferacji i cyklu komórkowego. Nanofilm wykonany z tlenku grafenu charakteryzował się obecnością grup tlenowych, które wpływały na jego hydrofilność. Natomiast ekstrakt z wątroby zarodka kury zawierał koktajl zawierający 1735 białek, a wśród najbardziej istotnych 57 białek: 8 białek odpowiedzialnych za adhezję, 8 białek odpowiedzialnych za organizację macierzy zewnątrzkomórkowej, 7 białek odpowiedzialnych za migrację, 19 białek odpowiedzialnych za przebieg cyklu komórkowego i proliferację oraz 15 białek odpowiedzialnych za apoptozę. Wyniki badań FTIR potwierdziły, że powierzchnia nanofilmu z tlenku grafenu sprzyjała adsorpcji białek, podczas której doszło do utworzenia chemicznych wiązań pomiędzy nanofilmem a białkami ekstraktu. Wyniki badań wykazały, że zarówno nanofilm z tlenku grafenu jak również ekstrakt z wątroby zarodka kury były nietoksyczne dla komórek linii HS-5, HepG2 i C3A. Wyniki badań morfologicznych potwierdziły biokompatybilność nanofilmu z tlenku grafenu wobec wszystkich linii komórkowych. Ponadto, Doktorantka wykazała, że dodanie do układu badawczego białek pochodzących z ekstraktu wątroby spowodowało rozluźnianie klastrów komórek. Potwierdziły to wyniki analizy ekspresji mRNA genów zaangażowanych w połączenia komórka-komórka: N-kadheryny, E-kadheryny i β -kateniny. W kolejnym etapie badań Doktorantka analizowała ekspresję dziewięciu kluczowych podjednostek integrzyn, które biorą udział we wszystkich etapach progresji nowotworu. Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe. Wykazały one zróżnicowaną ekspresję badanych integrzyn pod wpływem nanofilmu z tlenku grafenu oraz białek pochodzących z ekstraktu wątroby, szczególnie znamienne, gdy oba czynniki badawcze zostały zastosowane jednocześnie. Obserwowana nadekspresja integryny $\alpha 5$ oraz kinazy ogniskowo-adhezyjnej FAK potwierdziło silną adhezję komórek HepG2 do mimicznej ECM, otrzymanej na bazie nanofilmu z tlenku

grafenu. Ponadto, wykonany przez Doktorantkę dwuwymiarowy test inwazji wykazał, że zastosowany nanofilm silnie hamował inwazję zarówno komórek nowotworowych jak i komórek prawidłowych. Zastosowanie ekstraktu nie wpłynęło na inwazyjność komórek zdrowych, jednak zwiększało inwazję komórek HepG2 i zahamowało inwazję komórek C3A. Zastosowanie obu czynników zwiększyło inwazyjność normalnych komórek i zahamowało inwazję zarówno HepG2 jak i C3A. Uzyskane wyniki, niewątpliwie wykazały integralność bodźców mechanicznych i biochemicznych w ich oddziaływaniu na komórkę, wskazując na tkankową specyficzność tych oddziaływań. Bardzo ciekawym aspektem badań była analiza wpływu mimicznej ECM na proliferację i cykl komórkowy. Wyniki testu BrdU wykazały, że nanofilm GO wraz z koktajlem białek hamował znacznie proliferację komórek oraz zmniejszył populację komórek nowotworowych HepG2 w fazie G2/M, czemu towarzyszyło zmniejszenie ekspresji białka licencjonującego replikację mcm2 i jądrowego antygenu komórek proliferujących pcna, odpowiedzialnych za wejście komórek do fazy G0 i S. Co istotne, mimiczna ECM jednocześnie nie wpłynęła na przebieg cyklu komórkowego linii prawidłowej HS-5.

Publikacja III - Sosnowska M, Kutwin M, Strojny B, Wierzbicki M, Cysewski D, Szczepaniak J, Ficek M, Koczoń P, Jaworski S, Chwalibog A, Sawosz E. Diamond nanofilm normalizes proliferation and metabolism in liver cancer cells. Nanotechnology, Science and Applications. 2021;2021:115-137.

Celem badań było wykazanie, czy nanofil utworzony przez nanocząstki diamentu może pełnić rolę aktywatora sygnału mechano-chemo-transdukcji, normalizującego ekspresję szerokiego profilu białek wewnątrzkomórkowych, a zwłaszcza białek zaangażowanych w adhezję, migrację i proliferację komórek. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań wykazały, że nanofilm z nanocząstek diamentu tworzył pofałdowaną powierzchnię z wyeksponowanymi grupami tlenowymi i składał się z domen bogatych głównie w hybrydyzację sp3, co czyniło go reaktywnym chemicznie. Efektem dużej reaktywności chemicznej nanofilu były istotne zmiany ekspresji białek cytoplazmatycznych i błonowych w komórkach HepG2 oraz białek cytoplazmatycznych i jądrowych w komórkach C3A. Komórki HepG2 hodowane na nanofilu z nanocząstek diamentu wykazywały zwiększoną ekspresję wielu receptorów komórkowych, w tym integryn $\beta 1$, $\alpha 6$ i $\alpha 2$, receptora efryny typu A2, nektyny 2, cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1, pleksyny-B2, receptora czynnika wzrostu fibroblastów 4 oraz peptydazy dipeptydylowej 4. Sygnalizacja pochodząca z integryny $\beta 1$ wywołała natomiast zmniejszenie ekspresji taliny - białka łączącego błonę z cytoszkieletem. Komórki HepG2 nie zmieniły dystrybucji komórek w fazach cyklu komórkowego i ekspresji kluczowych białek zaangażowanych w proliferację. Bardzo interesującym wynikiem była zwiększona ekspresja kilku potencjalnych onkogenów zaangażowanych w strukturę porów jądrowych (NUP37), deubikwitynację białek (USP17L10), cytokinezę (SEPT9), upakowanie chromatyny (MACROH2A1) oraz aktywację mTORC1 na lizosomach (LAMTOR), której jednak nie towarzyszył wzrost inwazji komórek. Mechanotransdukcja pochodząca z nanofilu zwiększyła ekspresję tylko jednego receptora

komórek C3A - integryny $\beta 1$, która w konsekwencji wywołała zmniejszenie ekspresji filaminy. Biorąc pod uwagę, że filamina i talina konkurują o miejsce wiązania integryny, uzyskane wyniki wskazały na zupełnie inne mechanizmy oddziaływania komórek HepG2 i C3A z nanofilmem diamentowym.

Reasumując, wyniki badań podjętych przez Doktorantkę udowodniły, że mechanotransdukcja, pochodząca z nanofilmów fullerenu, tlenku grafenu i diamentu, a także tych nanofilmów w interakcji z koktajlem białek optymalizuje ekspresję integryn – pierwszej linii białek kooperujących z ECM. Sygnał z macierzy odbierany przez integryny był przekazywany dalej do białek znajdujących się pod błoną komórkową oraz do aktywności cytoszkieletu i ostatecznie determinował ekspresję genów i białek zaangażowanych w adhezję, migrację, metabolizm i proliferację. Analiza wyników zaprezentowanych w 3 publikacjach jednoznacznie wykazała, że badane nanofilmy węglowe wykazują bardzo obiecujące właściwości, które pozwalają na pełnienie przez nie funkcji mimicznej macierzy ECM w warunkach *in vitro*. Z ogromnym zainteresowaniem będę oczekiwała na wyniki dalszych badań *in vivo*. W związku z tym ciekawia mnie dalsze plany badawcze doktorantki.

Podsumowanie

Reasumując, cel pracy został sprecyzowany przez Doktorantkę jasno i konkretnie. Liczne i różnorodne metody badań zostały poprawnie dobrane. Mam drobną uwagę, która dotyczy określania przez Doktorantkę wyników testów MTT i XTT jako miary żywotności komórek. Jest to dosyć powszechnie stosowana praktyka, jednak faktycznie, wspomniane testy mierzą aktywność metaboliczną dehydrogenazy mitochondrialnej, a nie bezpośrednio żywotność komórek. Obniżenie aktywności metabolicznej komórki prowadzi najczęściej do jej śmierci (obniżenia żywotności), ale może również być oznaką przejściowego zatrzymania proliferacji komórek. Pomijając tę uwagę, wyniki pracy są spójne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat możliwości wykorzystania nanofilmu z alotropowych form węgla jako potencjalnej biomimicznej macierzy zewnątrzkomórkowej ECM, która moduluje transdukcję mechaniczną i chemiczną w komórkach nowotworowych wątroby. W pracy nie znalazłam elementów, które budziłyby jakiegokolwiek merytoryczne wątpliwości. Od strony językowej i formalnej recenzowana rozprawa nie budzi wątpliwości. Oczywiście, jak w każdym tego typu opracowaniu, również i w pracy przedstawionej przez mgr Malwinę Sosnowską można znaleźć drobne usterki literowe, jednak z mojego doświadczenia wynika, że takie usterki zdarzają się nawet w prestiżowych wydawnictwach po profesjonalnej korekcie wydawniczej, stąd nie należy moim zdaniem przywiązywać do nich dużej wagi. Dyskusja uzyskanych wyników badań prowadzona jest w sposób dowodzący doskonałej znajomości nie tylko piśmiennictwa, a także wiedzy ogólnej z zakresu pracy i dowodzi odwagi Doktorantki w formułowaniu własnych wniosków. W mojej opinii uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzialnych za oddziaływanie między nanofilmem z alotropowych form węgla, a komórkami nowotworowymi otwiera nowy rozdział nie tylko w badaniach podstawowych, ale również w badaniach translacyjnych nad poszukiwaniem biomimetycznego materiału,

który będzie zdolny do wspierania, ulepszenia i częściowego zastąpienia zdegradowanej macierzy ECM w łożu poresekcyjnej guza. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem ogromnej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Zawartość merytoryczna rozprawy, która została opublikowana w recenzowanych czasopiśmie o wysokiej wartości IF, świadczy o dojrzałości naukowej i doskonałym warsztacie badawczym, co w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień doktora. W myśl wymagań Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2017 poz. 1789, z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w związku z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku – przepisy wprowadzające ustawę prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 2018 roku poz. 1669) wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Malwiny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wagę podjętego tematu, bardzo szeroki zakres prac doświadczalnych, ich interdyscyplinarność, wysoki poziom naukowy, nowatorski charakter i kluczowy wpływ na rozwój nauki oraz wartość praktyczną, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie o wyróżnienie rozprawy wykonanej przez Panią mgr Malwinę Sosnowską.

Anna Laukoff