

Prof. dr hab. inż. Piotr Niedzielski,

Łódź, 20 czerwca 2024r.

Instytut Inżynierii Materiałowej

Politechnika Łódzka

Recenzja pracy doktorskiej

mgr inż. Barbary Wójcik

pt. „Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych”

Promotor: Dr hab. inż. Mateusz Wierzbicki, profesor SGGW

Opinię niniejszą wykonałem na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie z dnia 18.04.2024. podpisanej przez Przewodniczącą Rady prof. dr hab. Agnieszkę Gniazdowską-Piekarską.

Wybór tematyki pracy

Szybko starzejące się społeczeństwo, styl życia (siedzący tryb życia, ciągły stres, niska aktywność fizyczna itp.), nieprawidłowa dieta (zbyt duża ilość produktów wysoko przetworzonych) to główne, ale nie jedyne czynniki które powodują niekorzystne zmiany zdrowotne w społeczeństwach, zwłaszcza wysoko rozwiniętych. Główne czynniki umieralności związane są z chorobami cywilizacyjnymi takimi jak: choroby układu sercowo-naczyniowego, otyłość, cukrzyca czy nowotwory, a ich skala zależy głównie od momentu ich zdiagnozowania, im bardziej rozwinięte, tym większa śmiertelność. Pozytywne zmiany zachodzące w ostatnich latach w technikach leczenia, a przede wszystkim diagnozowania, nie idą w parze z ich dostępnością dla szerokiego społeczeństwa. Kolejnym niekorzystnym czynnikiem wpływającym na zdrowie ludzi jest coraz częściej występująca lekooporność powodująca spowolnienie lub wręcz uniemożliwienie leczenia chorób. Powszechnie znana jest w społeczeństwie, głównie przez „ich medialność” odporność bakterii na antybiotykoterapię wynikająca, w dużej mierze z nadużywania antybiotyków przez pacjentów już od najmłodszych lat. Statystyki pokazują, że tylko w pierwszej dekadzie XXI wieku w krajach wysokorozwiniętych OECD ich spożycie wzrosło o 36%. Problem ten jest jednak dużo szerszy i niewrażliwość na działanie leków coraz częściej występuje również w chorobach wirusowych (np. AIDS, zapalenie wątroby typu B czy C), pasożytniczych, czy wywołanych grzybami. Problem ten niestety nie ominął również pacjentów chorych na różnego rodzaju nowotwory. Badania realizowane w wielu najlepszych ośrodkach naukowych na świecie poświęcone są poznaniu mechanizmów lekooporności, jej przełamaniu, odkrywaniu nowych leków oraz wprowadzaniu nowych alternatywnych sposobów leczenia. Jedną z nich są badania nad wykorzystaniem nanomateriałów w leczeniu chorób nowotworowych. Cechy nanomateriałów, takie jak ich wielkość, zróżnicowanie form, powierzchnia właściwa, możliwość funkcjonalizacji, czy właściwości biologiczne, jak choćby cytotoksyczność stają /stały się ciekawą alternatywą w rozwoju nowoczesnych/ ukierunkowanych metod leczenia i diagnozowania. Niestety wiedza na ten temat mimo ciągłego rozwoju jest jeszcze na etapie dość wstępnym i wymaga wielu badań interdyscyplinarnych: biologicznych, medycznych, jak również inżynierskich (materiały, technologie wytwarzania itp.). Z tego poziomu uznać należy, że tematyka rozprawy doktorskiej **mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik** pt.: *„Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych”* jest bardzo aktualna, perspektywiczna i wnosząca w tej tematyce nową wiedzę, która przyczynić się może do opracowania alternatywnych do obecnych metod leczenia nowotworów.

Uwagi ogólne

Rozprawa **mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik** napisana została w formie monografii i zawiera zbiór 3 publikacji stanowiących podstawę wniosku o nadanie stopnia doktora wraz z rozdziałami uzupełniającymi. Z punktu widzenia formalnego, nie wzbudza żadnych kontrowersji, ponieważ jest to wersja jedna z wielu jaką przewidział ustawodawca w akcie prawnym jakim jest „Prawo o szkolnictwie wyższym”.

Przesłana do opinii rozprawa składa się z 11 rozdziałów, w tym streszczenia w języku polskim i angielskim (rozd. 1), wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską (rozd. 2), wykazu skrótów (rozd. 3), wstępu (rozd. 4), hipotezy badawczej, celu i zakresu pracy (rozd. 5), metodyki badań (rozd. 6), omówienia głównych wyników przeprowadzonych doświadczeń (rozd.7), podsumowania (rozd. 8), wniosków (rozd. 9), bibliografii (rozd.10) oraz kopii publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej (rozd.11). Praca uzupełniona jest o oświadczenia dotyczące współautorstwa prac.

Cel i teza rozprawy

Przeprowadzone w ramach doktoratu badania naukowe oparte zostały na **hipotezie badawczej**, która brzmi: *„Nanocząstki metaliczne oraz nanomateriały węglowe indukują śmierć komórek poprzez perforację błon komórkowych, oraz indukcję stresu oksydacyjnego. Efekt wywoływany przez nanocząstki oraz nanomateriały jest komórkowo specyficzny. Nonofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych zwiększa adhezję komórek oraz hamują ich proliferację po przez zaburzenie procesów podziału komórkowego. Cytotoksyczność nanocząstek diamentu jest komórkowo specyficzna i zależy od czynników takich jak rozmiar nanocząstek, obecność grup funkcyjnych na ich powierzchni oraz metoda produkcji”*.

W rozprawie pojawiają się pojęcia: podstawowy i szczegółowe cele naukowe oraz zakres pracy. Jako cel główny Doktorantka wskazała: *„określenie potencjalnych właściwości antynowotworowych nanocząstek metalicznych oraz nanomateriałów węglowych na komórki nowotworowe charakteryzujące się występowaniem zjawiska lekooporności, w tym komórki nowotworu: piersi (MDA.MB.231, MCF-7), trzustki (BxPC-3, AsPC-1), wątroby (Hep G2) oraz glejaka IV stopnia (U-118 MG, T98G, U-87 MG). Co więcej niniejsze badania miały na celu analizę wpływu nanomateriałów węglowych jako środka stabilizującego ECM, na aktywność proliferacyjną oraz adhezję komórek glejaka IV stopnia U-87 MG oraz raka piersi MDA.MB.231”*.

Drogą do realizacji celu głównego i udowodnienia hipotezy były postawione trzy cele szczegółowe związane z eksperymentami podzielonymi w ten sposób, że stały się podstawą trzech publikacji stanowiących główny aspekt doktoratu. Podejście takie pokazuje, że od samego początku realizacji pracy Doktorantka miała przemyślaną koncepcję pracy, całą metodykę badań, jak i zakres w poszczególnych etapach i następnie konsekwentnie je realizowała.

Zakres pracy obejmuje między innymi charakteryzację nanomateriałów, określenie ich potencjału toksycznego oraz ich wpływ na wybrane komórki nowotworowe, w tym trzustki, glejaka i piersi.

Analizując ten rozdział stwierdzam, że postawiony cel jest jasno sprecyzowany i doprecyzowany w zdefiniowanych celach szczegółowych, co potwierdza się w późniejszej realizacji pracy, gdzie można znaleźć odpowiedzi na postawione problemy. Również zakres pracy określony jest w sposób jasny i czytelny dla recenzenta, jak również zgodny z tematyką pracy.

Nieco inna sytuacja ma się z postawioną hipotezą. Jako recenzent odniosłem wrażenie, że jest ona postawiona trochę na siłę bardziej w formie odpowiedzi na problem (już zrealizowany) niż hipotezy. Wynikać to może ze złego sformułowania, zwłaszcza jej

drugiej części (od słów: *Nonofilmy utworzone z nanomateriałów.....*).

Warto tutaj zauważyć, że nie ma formalnego obowiązku stawiania hipotez badawczych w rozprawach doktorskich, a recenzowana praca poprzez zrealizowany zakres i jakość badań i tak bez problemu broni się sama.

Ocena merytoryczna pracy

Rozprawa doktorska oparta jest na trzech wieloautorskich publikacjach, w których doktorantka jest pierwszą autorką. Są to prace:

1. **Wójcik B**, Sawosz Chwalibóg E, Szczepaniak J, Strojny-Cieślak B, Sosnowska M, Daniluk K, Zielińska-Górska M, Bałaban J, Chwalibog A, Wierzbicki M. Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:1–21. doi:10.3390/ijms222212100 (IF5=6,2; 140pkt)
2. **Wójcik B**, Zawadzka K, Sawosz Chwalibóg E, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2023; 16:41–57. doi:10.2147/nsa.s439185 (IF5=5,9; 200pkt)
3. **Wójcik B**, Zawadzka K, Jaworski S, Kutwin M, Sosnowska-Ławnicka M, Ostrowska A, Grodzik M, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Wierzbicki M. Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines. *Nanotoxicology*. 2023;17:310–337. doi:10.1080/17435390.2023.2218925 (IF5=5,2; 140pkt)

Wszystkie prace opublikowane zostały w bardzo dobrych czasopismach o współczynniku wpływu IF wynoszącym odpowiednio: 5,2; 5,9 i 6,7 oraz punktach zgodnych z wykazem MNiSW: 140 dwie publikacje i 200 jedna publikacja. Łączna suma IF wynosi 17,3, a punktów ministerialnych 480.

W przypadku rozpraw ocenianych na podstawie wykazu publikacji, jeżeli są one publikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych (a tutaj ma to miejsce) uważam, że rolą opiniującego nie jest ich ponowna recenzja, a odpowiedzenie na następujące pytania:

- Czy prace są zgodne z tematyką rozprawy?,
- Jaka jest rola Doktorantki w ich realizacji, zarówno w zakresie badań jak i tworzeniu publikacji ?
- Czy z publikacji wynika posiadanie wiedzy teoretycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych z zakresu tematyki pracy?
- Czy rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu?

Rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Wójcik edycyjnie została wzbogacona o szeroki przewodnik (ok. 30 stron) obejmujący: opis metodyki badań wraz z podziałem na doświadczenia przypisane do każdej z trzech prac oraz omówienie

głównych wyników z przeprowadzonych doświadczeń. Taki układ pracy wraz z podsumowaniem i wnioskami pomaga dodatkowo odpowiedzieć na postawione powyżej pytania.

Czy prace są zgodne z tematyką rozprawy?

Tematyka pracy 1 obejmuje analizę wpływu nanomateriałów metalicznych takich jak: srebro, złoto, platyna oraz węglowych: tlenek grafenu, cząstki nanokrystalicznego diamentu oraz fulerenolu na linie komórkowe raka trzustki. Badano cytotoxycność tych materiałów w zależności od stężenia oraz od wielkości nanocząstek.

Tematyka pracy 2 całym zakresem obejmuje badania wpływu nanomateriałów na adhezję i proliferację komórek nowotworowych. Poza używanymi w innych publikacjach nanomateriałami metalicznymi i węglowymi otrzymanymi bezpośrednio od producenta, do badania przygotowano własne próbki w postaci nanofilmów.

Tematyka pracy 3 dotyczy badania zależności cytotoxycności nanocząstek diamentu od podstawowych parametrów fizykochemicznych. Do badań wykorzystano 13 rodzajów nanokrystalicznego diamenty różniących się między sobą metodą produkcji, dostawcą materiału badawczego, rozmiarem oraz sposobem funkcjonalizacji i głównie sprawdzano ich cytotoxycność w stosunku do linii komórkowych glejaka, raka piersi i raka wątroby.

Analiza trzech przedstawionych jako główne osiągnięcie w rozprawie doktorskiej publikacji, pozwala jednoznacznie stwierdzić, że ich zakres tematyczny i obszar badań mieści się w tematyce rozprawy.

- Jaka jest rola doktorantki w ich realizacji badań i tworzeniu publikacji ?

Zarówno z analizy oświadczeń, jak i roli poszczególnych autorów w przygotowaniu publikacji zgłaszanych w wydawnictwach na etapie ich oceny, wynika znaczący wkład mgr inż. Barbary Wójcik w przygotowaniu materiału do publikacji. W przypadku 1 i 2 publikacji (wraz z suplementami) wykonała ona samodzielnie wszystkie badania, których wyniki użyto do publikacji oraz przygotowała manuskrypt do publikacji i brała udział w procesie recenzji. Z przytoczonych oświadczeń pozostałych współautorów wynika, że wspomagali doktorantkę w zakresie przygotowania koncepcji, doboru metodyki badań, w tym urządzeń badawczych, jak i recenzowali wewnętrznie publikację. Podobnie sytuacja ma się z 3 publikacją, przy czym jedno z badań: spektroskopia ramanowska wykonana została we współpracy z Politechniką Warszawską. Nie jest to w żaden sposób uchybienie, czy podważenie wartości pracy, a wręcz odwrotnie, bo pokazuje doktorantkę, jako osobę dojrzałą naukowo i sięgającą po metody badawcze pozwalające na podniesienie poziomu badań, a nie ograniczającej się do „własnego podwórka” laboratoryjnego. Jediną wadą zauważoną przez recenzenta jest, to że w żadnej z prac doktorantka nie jest redaktorem korespondencyjnym, co jeszcze dodatkowo podkreśliłoby jej rolę w powstaniu prac.

- Czy z publikacji wynika posiadanie wiedzy teoretycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych z zakresu tematyki pracy?

Odpowiedź na to pytanie udzielona została częściowo w poprzednim akapicie i oczywiście brzmi twierdząco, We wszystkich pracach, jak i w przewodniku do nich doktorantka wykazała się umiejętnością analizy teoretycznej, tj. doboru i

analizy publikacji z czasopism zarówno typowo biologicznych, medycznych, jak i inżynierskich (materiałowych) oraz metodyki badań. W tej części wykazuje analizę łącznie 142 prac naukowych opublikowanych w większości w wysoko punktowanych czasopismach. Pokazuje to na doskonałe przygotowanie merytoryczne (posiadanie wiedzy teoretycznej) w tym zakresie, co zapewne przełożyło się na precyzyjne określenie zakresu realizowanej pracy, metodyki badań, postawienie szczegółowych celów i hipotezy, jak i pozwoliło na uniknięcie ewentualnych "ślepych uliczek" w realizacji badań. Zastosowane w badaniach własnych metody badawcze takie jak: mikroskopia TEM, SEM, AFM, odwrócona mikroskopia świetlna, mikroskopia konfokalna, pomiar potencjału ZETA, spektroskopia ramanowska, testy biologiczne na liniach komórkowych itp., jak również analiza i interpretacja wyników badań pokazują również bardzo dobre przygotowanie praktyczne, a więc posiadanie dobrego warsztatu badawczego i umiejętność jego wykorzystania.

W rozprawie znalazły się, jak w każdej tego typu pracy nieliczne błędy i niedopowiedzenia natury merytorycznej i edycyjnej.

1. W pracy występują sprzeczne informacje dotyczące wpływu technologii wytwarzania na cytotoksyczność materiałów (np.str.9, 11, a str. 22 – hipoteza, praca nr 3). Proszę doktorantkę o wy tłumaczenie tych sprzeczności.
2. Analizując publikacje, zwłaszcza trzecią trudno jest się dopatrzeć jakie technologie wytwarzania były zastosowane (lub jakie parametry były zastosowane). Pojęcia takie jak metoda detonacyjna, czy synteza laserowa są niewystarczające moim zdaniem do określenia wpływu technologii wytwarzania na właściwości nanomateriałów, zwłaszcza biologiczne. Wydaje się, że były to bardziej badania produktów wytworzonych przez określone firmy i trudno byłoby odnieść się w badaniach do technologii wytwarzania (technologie tego typu, zwłaszcza metoda detonacyjna nie są do końca powtarzalne i różnić się mogą samą metodą, parametrami wytwarzania i użytymi materiałami). Poproszę doktorantkę o komentarz tej sprawie.
3. Jedną z cech nanomateriałów jest ich duża powierzchnia właściwa. Doświadczenia własne recenzenta pokazują, że informacje na ten temat, uzyskane od producenta wielokrotnie mijały się z rzeczywistością. Czy parametr ten był sprawdzany przez doktorantkę, czy zawsze przyjmowano podawane wartości (np. GN powierzchnia 750m²/g)? Uwaga ta dotyczy również innych parametrów (część z nich Doktorantka analizowała we własnym zakresie np. rozmiary cząstek).
4. Doktorantka wielokrotnie w pracy używa pojęcia nanofilm. Proszę Doktorantkę o doprecyzowanie w jaki sposób rozumie/ interpretuje to pojęcie?
5. Dlaczego spektroskopia ramana została zastosowana tylko w eksperymencie III do cząstek ND, a nie pozostałych materiałów węglowych, opisywanych w pozostałych publikacjach? W tym zakresie również należałoby nieco dokładniej poddać analizie uzyskane wyniki (zauważyć jednak należy, że nie jest to sprawa prosta, ponieważ w literaturze naukowej występuje wiele sprzeczności na ten

temat).

6. Które z analizowanych przez doktorantkę nanomateriałów, jej zdaniem jest najbardziej perspektywiczny i dający nadzieję na praktyczne zastosowanie? Jakie kolejne kroki badawcze należy podjąć aby zdobyć nową lub rozszerzyć już pozyskaną przez nią wiedzę?

Większość z tych uwag ma charakter polemiczny, porządkujący i nie wpływają one na bardzo wysoką ocenę rozprawy jako całości. Praca edycyjnie wykonana bardzo starannie. Główny nacisk w badaniach postawiony został, co zrozumiałe na analizę właściwości biologicznych, głównie cytotoksyczności. Pozwoliło to na osiągnięcie celów postawionych na początku pracy, jak i udowodnienie hipotezy. Warto w tym miejscu zachęcić doktorantkę do szerszej współpracy z zewnętrznymi jednostkami z zakresu analiz materiałowych.

Z całości rozprawy wyłania się sylwetka Doktorantki, jako osoby posiadającej szeroką wiedzę teoretyczną, potrafiąca zaplanować, a następnie wykonać eksperyment, przeanalizować wyniki i wyciągnąć z nich wnioski. Dodatkowo, co niezwykle ważne posiada umiejętność pokazania swoich osiągnięć naukowych szerszemu gremium, poprzez publikowanie ich w dobrych czasopismach. Biorąc całość działań doktorantki plus jakość publikacji (wyrażonych współczynnikami IF i punktami MNiSW) warto rozważyć wyróżnienie pracy i taki wniosek jako recenzent pozwalam sobie postawić.

Ocena końcowa

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego w zakresie właściwości biologicznych i potencjalnego wykorzystania wybranych nanomateriałów jako alternatywy leczenia nowotworów w przypadku występowania lekozależności (odpowiedź na ostatnie pytanie postawione w recenzji). Mimo, że badania o podobnym zakresie prowadzone są w wielu ośrodkach, to należy stwierdzić, że uzyskane wyniki, zwłaszcza w zakresie nanokrystalicznego diamentu rozszerzają i wnoszą nową wiedzę w dziedzinie nauk ścisłych w dyscyplinie nauki biologiczne.

W świetle powyższej opinii, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Wójcik zatytułowana: „*Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych*”, **spełnia wszystkie wymagania** stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dziennika ustaw: **Dz. U. z 2023 r. poz. 742**) i wnoszę **o dopuszczenie mgr inż. Barbary Wójcik do dalszego procedowania przewodu doktorskiego w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Niedzielski

prof. dr hab. inż. Piotr Niedzielski