

Prof. dr hab. inż. Małgorzata Jakubowska
Wydział Mechaniczny Technologiczny
Politechnika Warszawska

Warszawa, 2.10.2023

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr Jarosław Szczepaniak

pt. Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Jarosława Szczepaniaka pt. „Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*” wykonana została w Instytucie Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w Katedrze Nanobiotechnologii pod kierunkiem dr hab. Marty Grodzik.

Rozprawę doktorską stanowią trzy publikacje z wysokopunktowanych, międzynarodowych czasopism o łącznej sumie Impact Factor 14,139 i liczbie punktów ministerialnych 420. Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych form alotropowych węgla, konkretnie materiałów z rodziny grafenowej, na toksyczność wobec komórek glejaka IV stopnia, szlak aktywacji apoptozy, działanie szlaków komórkowych i modulację mechanizmów adhezji. Hipoteza oraz cel pracy zostały poprawnie sformułowane a przedstawiony zakres pracy w pełni odpowiada wykonanym badaniom.

Rozprawa doktorska składa się 11 rozdziałów. Na początku pracy podano wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską oraz wykaz stosowanych skrótów. Bibliografia, umieszczona w rozdziale 10 obejmuje 98 pozycji literaturowych, w większości aktualnych. We wstępie (rozdział 4.) autor w przystępny sposób wprowadza w tematykę pracy doktorskiej. Przedstawiona w rozdziale 6 metodyka badań wyczerpująco opisuje oraz ilustruje w postaci schematów wykorzystane w pracy materiały, sposób ich charakteryzacji, modele biologiczne *in vitro* oraz układ doświadczeń. W tymże rozdziale autor dokonał podziału wykonanych prac na 5 odrębnych eksperymentów nazwanych doświadczeniami, które w rzeczowy i przejrzysty sposób określają kolejne etapy prac, zaczynają od charakteryzacji materiałów poprzez badania procesów komórkowych istotnych w rozwoju komórek

glejaka IV stopnia. Autor przedstawił szczegółowe cele każdego z doświadczeń oraz opisał szczegółową metodologię wykonanych badań. Opisane w kolejnym rozdziale wyniki badań, stanowiące zasadniczą część pracy, przedstawiają: analizę fizykochemiczną badanych materiałów (płatków zredukowanego tlenku grafenu rGO oraz płatków grafenu GN), badania żywotności glejaka IV stopnia i komórek prawidłowych Hs5, próbę określenia wpływu materiałów węglowych na parametry morfologiczno-funkcyjne komórek oraz na procesy adhezji i migracji w komórkach glejaka a także zmian zachodzących w błonie komórkowej pod ich wpływem. Rozdział 8 to podsumowanie pracy.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że Doktorant rozwiązał postawione zagadnienie badawcze. Przeprowadził szereg badań aby porównać wpływ materiałów węglowych na toksyczność wobec komórek glejaka IV stopnia. Najważniejsze wyniki prac eksperymentalnych zebrane zestawione zostały w czytelny sposób w postaci tabeli. Wyniki badań zgadzają się z postawioną na początku pracy hipotezą. Autor potwierdza, że chemia powierzchni i rozmiar płatków materiałów z rodziny grafenowej odgrywają kluczową rolę w toksyczności i mogą wywierać różny wpływ na komórki. Przedstawione szczegółowe wyniki, niewątpliwie cenne, poszerzają wiedzę o podstawowych oddziaływaniach nanomateriałów węglowych względem komórek. Należy jednak zwrócić uwagę, że nie są one do końca wyczerpujące, nasuwają się pojedyncze pytania.

Autor zbadał 4 różne materiały grafenowe. Były to trzy materiały płatków zredukowanego tlenku grafenu (rGO), różniące się sposobem redukcji oraz jeden materiał płatków grafenu wyprodukowanego metodą bezpośredniego złuszczenia grafitu (GN). Jest to za mało próbek do wykonania pełnego porównania sposobów oddziaływania na komórki różnych nanocząstek węglowych. Dla prawidłowego porównania ważne byłoby także np. zbadanie płatków grafenowych otrzymywanych innymi technikami czy rozmiarami. Na oddziaływanie nanomateriałów węglowych na komórki wpływają nie tylko liczba grup funkcyjnych tlenu, ale także wiele innych czynników, jak choćby kształt i wymiary nanocząstek. Autor w pracy napisał, że „płatki grafenu o większym rozmiarze i wyższym stopniu utlenienia (rGO) mogą wykazywać większą cytotoksyczność w porównaniu do GN” (str. 41). To zdanie sugeruje, że większe nanocząstki powinny być bardziej toksyczne. W pracy zbadano zawartości grup tlenowych rGO i GN, nie zbadano jednak wpływu wymiarów nanocząstek węglowych na komórki. Ponieważ badany był tylko jeden rodzaj GN nie ma w pracy potwierdzenia, że wymiary GN mają tu kluczowe znaczenie. Należy postawić także pytanie czy nie należy przeprowadzić badań z wykorzystaniem innych nanomateriałów węglowych np. nanorurek węglowych?

Autor w pracy prowadził badania na komórkach glejaka IV stopnia, który jest złośliwym pierwotnym guzem mózgu. Jest to całkowicie uzasadnione. Oczywiście jest, że

odnalezienie skutecznego sposobu leczenia tego nowotworu jest niezwykle istotne. Wykorzystanie nanomateriałów grafenowych w terapii jest bardzo nowatorskim podejściem, wymagającym wielu badań. Może warto byłoby wyjaśnić, dlaczego jednak autor jako komórki zdrowe zastosował komórki zrębu szpiku o morfologii fibroblastów Hs5?

Autor w podsumowaniu doświadczenia II stwierdza: „Podsumowując, wszystkie badane materiały węglowe są toksyczne zarówno do komórek U87, jak i komórek Hs5” (str. 32). Jeśli wykazano toksyczność nanomateriałów grafenowych zarówno w stosunku do komórek nowotworowych jak i zdrowych, czy zastosowanie tych materiałów w leczeniu nowotworów będzie kiedykolwiek możliwe tak, aby nie zaszkodzić zdrowym komórkom?

Praca jest napisana poprawnym językiem, ale pod względem językowym posiada pewne mankamenty, które nie wpływają jednak na czytelność pracy. Autor nie ustrzegł się literówek i błędów w skrótach, m.in. nFGO zamiast GO (str. 18), określenie skaningowa mikroskopia elektronowa TEM zamiast SEM (str. 29), nanomateriały grafenowe ND zamiast NG (str. 33). Rzucającym się w oczy jest błąd leksykalny dotyczący niepoprawnego użycie słowa sonifikacja (m. in. str. 20-21). Autor zapewne miał na myśli sonikację, czyli proces związany z użyciem ultradźwięków dla rozbicia aglomeratów i agregatów nanocząstek. Można także uznać, że wielokrotnie użyte (str. 24-27) określenie: „komórki potraktowano płatkami grafenowymi” czy też „komórki traktowano badanymi materiałami węglowymi” jest po polsku określeniem kolokwialnym i wynika z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego ze słowa *treated*.

Mimo tych drobnych usterek, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Jarosława Szczepaniaka jest pracą naukową bardzo wartościową dla rozwoju inżynierii biomedycznej. W niewątpliwy sposób przedstawione wyniki poszerzają wiedzę w dziedzinie i potwierdzają, że materiały grafenowe mają ogromny potencjał biologiczny. Chociaż, jak sam autor zauważa, niezbędne są dalsze badania dążące do poznania mechanizmów działania nanomateriałów grafenowych na komórki, mnogość badań, obserwacji i wniosków, które poczynił doktorant jest godna uznania i plasuje tę rozprawę na bardzo wysokim poziomie. Przedstawione wyniki wskazują na to, że cel rozprawy został osiągnięty, a przedstawiona hipoteza udowodniona. Całość pracy stanowi dobrze udokumentowany materiał badawczy. Przeprowadzone badania podstawowe wnoszą bardzo dużo nowej wiedzy związanej ze sposobem oddziaływania materiałów grafenowych na komórki nowotworowe, mają w przyszłości szansę wpłynąć na postrzeganie i zastosowanie nanomateriałów w leczeniu nowotworów.

Biorąc pod uwagę powyższe oraz szerokie spektrum przeprowadzonych badań stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Jarosława Szczepaniaka pt. Wybrane materiały

grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro* spełnia wymagania i warunki stawiane rozprawom doktorskim warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. Poz. 742).
.i wnoszę o dopuszczenie jej Autora do publicznej obrony.

M. Polubarska