

Dr hab. inż. Agnieszka Majkowska-Pilip  
Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej  
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

Warszawa, 11.08.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej

**Pana mgr Jarosława Szczepaniaka**

zatytułowanej „Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modulujące szlaki apoptotyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*”

wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Marty Grodzik oraz Pani dr Barbary Strojny-Cieślak

Glejak wielopostaciowy IV stopnia (*ang. Glioblastoma multiforme, GBM*) jest najbardziej agresywnym i złośliwym nowotworem mózgu pochodzącym z komórek glejowych. Charakteryzuje się on szybkim tempem wzrostu i intensywnym naciekaniem okolicznych tkanek mózgu, co czyni jego leczenie bardzo trudnym. Terapia glejaka wielopostaciowego IV stopnia obejmuje chirurgiczne usunięcie guza, jeśli jest to możliwe, radioterapię i chemioterapię. Niestety, ze względu na heterogeniczny charakter guza i jego oporność na stosowane terapie, wyleczenie jest praktycznie niemożliwe, a średni czas przeżycia pacjentów jest zwykle ograniczony. Nowotwór ten stanowi ciągle poważne wyzwanie dla medycyny i wciąż wymaga badań i opracowania innowacyjnych terapii, aby zwiększyć szanse na skuteczne leczenie tak agresywnej choroby. Przedstawiona do oceny praca doktorska bardzo dobrze wpisuje się w ten ważny kierunek badawczy. Autor w ramach prowadzonych eksperymentów zbadał wpływ płatków grafenu oraz zredukowanych tlenków grafenu na toksyczność, szlaki aktywacji apoptozy, cykl komórkowy, sygnalizację związaną z funkcjonowaniem błony komórkowej oraz modulację mechanizmów adhezji i migracji. Badania biologiczne *in vitro* zostały wykonane na glejakowych komórkach nowotworowych U87 oraz porównawczo na komórkach prawidłowych Hs5.

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowi cykl 3 opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Wyniki prac badawczych zostały zamieszczone w renomowanych czasopiśmie naukowych jak

*International Journal of Molecular Sciences*, czy też *Materials*, w latach 2018-2022. Sumaryczny współczynnik IF tych prac wynosi powyżej 14, natomiast liczba punktów wg. MEiN 420. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach, co świadczy o jego istotnym wkładzie w prowadzenie badań. Na podstawie załączonych oświadczeń współautorów publikacji, Doktorant był odpowiedzialny za projektowanie i wykonywanie doświadczeń, jak również opracowywanie wyników i przygotowanie manuskryptów. Jego procentowy udział w każdym artykule był wysoki i wynosił odpowiednio 64, 70 oraz 71%.

Praca doktorska Pana mgr Jarosława Szczepaniaka podzielona została na 6 zasadniczych części: wstęp teoretyczny, hipotezę badawczą, cel i zakres pracy, metodykę badań, omówienie wyników prac eksperymentalnych oraz podsumowanie i wnioski. Dysertacja zawiera także streszczenia zarówno w języku polskim, jak i angielskim oraz alfabetyczny wykaz stosowanych skrótów. Manuskrypt kończy zestawienie bibliograficzne, 98 pozycji piśmiennictwa, większość z ostatnich lat. Dodatkowo dołączono kopie cyklu prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej oraz oświadczenia wszystkich współautorów dotyczące ich wkładu w powstanie publikacji. Przedstawione w cyklu prace mają charakter interdyscyplinarny i powstały we współpracy z Instytutem Mikroelektroniki i Fotoniki w Warszawie (Sieć Badawcza Łukasiewicz) oraz Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej jednostki macierzystej. Badania zostały przeprowadzone w ramach realizacji prestiżowego grantu NCBiR – LIDER. Takie podejście ukazuje dojrzałość Doktoranta oraz gotowość do współpracy naukowej z różnymi zespołami w celu znalezienia optymalnych rozwiązań dla badanego problemu.

We wstępie teoretycznym Doktorant opisuje różnice strukturalne między grafenem, tlenkiem grafenu oraz zredukowanym tlenkiem grafenu i wynikające z nich właściwości, a następnie omawia dotychczasowe próby wykorzystania materiałów węglowych w leczeniu glejaka wielopostaciowego. Autor zwraca też szczególną uwagę na obecność grup tlenowych w pochodnych grafenu, które mogą prowadzić do zakłócenia szlaków sygnałowych w błonie plazmatycznej bądź też oddziaływać bezpośrednio ze strukturami odbierającymi sygnały elektryczne jak np. kanałami jonowymi. Ponadto, Doktorant koncentruje się na rozróżnieniu procesów migracji i inwazyjności oraz wpływów na nie złożonych procesów komórkowych i molekularnych. Rozdział ten napisany jest poprawnie, językiem zwięzłym i zrozumiałym, wskazuje na dobrą znajomość tematyki badań.

W kolejnej części pracy Doktorant jednoznacznie precyzuje nadrzędny cel projektu, którym było zbadanie i porównanie wpływu wybranych form alotropowych węgla na toksyczność komórek nowotworowych glejaka IV stopnia oraz związany z tym szlak aktywacji apoptozy, działanie szlaków komórkowych w błonie komórkowej oraz modulację mechanizmów adhezji. Zakres pracy został przedstawiony jasno i klarownie.

W części „Metodyka badań” Kandydat w sposób szczegółowy opisuje doświadczenia laboratoryjne oraz stosowane analizy. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie szeregu różnych metod analitycznych oceniających morfologię i wielkość materiałów węglowych. Właściwości fizykochemiczne były badane m.in. za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skaningowej mikroskopii elektronowej, rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (XPS), mikroskopii konfokalnej, spektroskopii Ramana i w podczerwieni (FTIR), analizy elementarnej i innych technik. Świadczy to o szerokiej wiedzy chemicznej Doktoranta. Ponadto, Doktorant wykazał się również dużym doświadczeniem w dziedzinie biologii przeprowadzając wiele eksperymentów *in vitro* na komórkach nowotworowych U87 oraz prawidłowych Hs5. Opis metod badawczych stanowi doskonały dowód na dogłębną znajomość zagadnienia oraz perfekcyjne opanowanie warsztatu badawczego. Każdy opis doświadczenia poprzedza jego cel, w związku z tym prezentowane w ten sposób, nawet skomplikowane informacje, są zrozumiałe i przystępne dla czytelnika.

Główne wyniki prac eksperymentalnych zostały opracowane szczegółowo i precyzyjnie. Doktorant przedstawił obszerną i wnikliwą analizę tematu. W badaniach fizykochemicznych form alotropowych węgla wykazał różnice w zawartości tlenu ze względu na obecność różnych grup funkcyjnych, a także różnice w przewodności, które warunkują szczególne właściwości biologiczne tych materiałów. Eksperymenty cytotoksyczności z wykorzystaniem testów MTT oraz czerwieni obojętnej Neutral Red (NR) pokazały, że płatkami najbardziej obniżającymi żywotność komórek są rGO/TUD (tlenek grafenu zredukowany dwutlenkiem tiomocznika), zaś tymi które najlepiej przylegały do błony komórkowej glejaka były rGO/ATS (tlenek grafenu zredukowany tiosiarczanem amonu) oraz rGO/TUD. W obserwacjach morfologii komórek traktowanych badanymi materiałami węglowymi Doktorant nie zauważył śladów płytek wewnątrz komórek, co oznacza że nie ulegały one internalizacji. Jest to najprawdopodobniej związane z rozmiarem grafenu i zredukowanych form tlenu grafenu. Najwyższy odsetek komórek w późnej apoptozie Autor zaobserwował w grupie traktowanej płatkami grafenu (GN/ExF). Wykazał on również, że wszystkie badane materiały obniżają potencjał błony

mitochondrialnej na podobnym poziomie, potwierdzając aktywację szlaku apoptozy zależnej od mitochondriów. Wpływ zastosowanych materiałów na ekspresję genów kanałów jonowych zależnych od napięcia był znaczący, ale nie jednoznaczny. Doktorant udowodnił, że formy grafenu i jego pochodnych mogą wpływać na ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych (uPar, CD105) znacznie obniżając ich ekspresję, wspomagając przez to wzrost adhezji komórek nowotworowych, a w konsekwencji mogą prowadzić do zmniejszenia ich migracji. Autor wykazał spadek ekspresji  $\beta$ -kateniny oraz FAK na poziomie białka po potraktowaniu rGO/ATS oraz rGO/TUD, co może przyczynić się do zmniejszenia inwazyjności komórek nowotworowych.

Przedstawiona do oceny praca stanowi wyczerpujące źródło informacji dotyczące prowadzonych badań. Doktorant wykazał się głęboką znajomością tematu, doskonałym opanowaniem technik badawczych oraz umiejętnością analizy i interpretacji wyników. Wnioski są bardzo dobrze sprecyzowane, co stanowi też wyzwanie przy opracowywaniu tak obszernego materiału. Przeprowadzone badania sugerują, że materiały węglowe mają ogromny potencjał biologiczny, jednakże mechanizmy ich działania są nadal niejasne.

Reasumując, praca doktorska jest niezwykle wartościowa i bez wątpienia wnosi istotny wkład w rozwój badań nad glejakiem wielopostaciowym IV stopnia. Może przyczynić się do opracowania efektywnych strategii terapeutycznych w walce z tak ciężką i nieuleczalną chorobą nowotworową.

Pracę mgr Jarosława Szczepaniaka oceniam wysoko, jednakże ze względu na pełnioną funkcję recenzenta, po dogłębnym zapoznaniu się z dysertacją nasuwają mi się pewne sugestie i pytania:

1. W „Metodyce badań” punkt 6.1 Materiały grafenowe, Autor przedstawia zdjęcia TEM płatków grafenu i zredukowanych tlenków grafenu. Podpis Ryciny 1 jest prawidłowy natomiast w tekście powyżej zdjęć, kolejność wymienianych materiałów węglowych nie zgadza się z faktyczną kolejnością przedstawionych zdjęć, co może powodować zamieszanie w umyśle czytelnika.
2. W Tabeli nr 2 podsumowującej najważniejsze wyniki prac eksperymentalnych części wymienianych doświadczeń wpisana jest w języku angielskim jak np. *Neutral Red*, *Human Receptor Antibody Array*. Wydaje mi się, że warto byłoby zachować jednolitość językową w całej Tabeli.
3. Szczególną moją uwagę zwraca Doświadczenie nr II, w którym Doktorant bada wpływ materiałów węglowych na żywotność komórek glejaka IV stopnia U87 jak i

prawidłowych Hs5. Wydawałoby się logicznym, aby wyniki testów MTT oraz NR były podobne, czy też wskazywały na najbardziej cytotoksyczną odmianę alotropową węgla. Wg testu MTT najbardziej efektywnym materiałem węglowym jest rGO/TUD, podczas gdy w przypadku eksperymentu z zastosowaniem czerwieni obojętnej najbardziej toksyczny jest rGO/ATS. Jak można wytłumaczyć aż takie różnice? Może warto było wykonać jeszcze dodatkowe testy cytotoksyczności albo sprawdzić czy badane nanomateriały wchodzi w interakcje z substratami wyżej wymienionych testów cytotoksyczności?

Drugie moje pytanie dotyczące wyników tego eksperymentu związane jest z testem z czerwienią obojętną. Doświadczenie to wykazało podobną toksyczność zarówno względem komórek nowotworowych jak i prawidłowych, podczas gdy wyniki z testu MTT dowiodły, że komórki prawidłowe są bardziej odporne na testowane nanostruktury. Czy możemy tutaj mówić o jakiegokolwiek selektywności w stosunku do glejaka? Czy istnieją realne szanse na zastosowanie tej terapii u pacjentów?

4. Głównie w rozdziale „Metodyka badań” pojawiają się drobne literówki związane z odmianą wyrazów, jednakże nie umniejsza to wartości pracy.
5. Szkoda, że Doktorant nie umieścił w pracy spisu wszystkich swoich publikacji, w których jest współautorem, czy też prezentacji konferencyjnych, stanowiących pełny dorobek naukowy. Opublikowanie artykułów w czasopismach o wysokim IF jest warte wspomnienia.

**Podsumowując uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j.: Dz. U. z 2023 r. poz. 742). Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych.**

**Wnioskuje o dopuszczenie mgr Jarosława Szczepaniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na bardzo wysoki poziom merytoryczny podjętych badań oraz biorąc pod uwagę istotną z punktu naukowego tematykę rozprawy wnoszę również do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Dr hab. inż. Agnieszka Majkowska-Pilip