

prof. dr hab. Katarzyna Ognik
Katedra Biochemii i Toksykologii
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, dn. 28.06.2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Szczepaniaka

pt. „Wybrane materiały grafenowe jako czynniki modelujące szlaki apoptotyczne i sygnalizację zewnątrzkomórkową w komórkach glejaka IV stopnia *in vitro*”, wykonanej w Katedrze Nanobiotechnologii, Instytutu Biologii SGGW w Warszawie pod opieką promotora dr hab. Marty Grodzik, prof. SGGW oraz promotora pomocniczego dr Barbary Strojny-Cieślak, przedstawionej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera ogółem 51 ponumerowanych stron. Ocenianą rozprawę stanowią trzy spójne tematycznie, oryginalne prace twórcze opublikowane w latach 2018-2022 w anglojęzycznych czasopismach naukowych indeksowanych przez Journal Citation Reports, które Autor załączył do rozprawy:

- 1) **Szczepaniak, J.; Strojny, B.; Sawosz Chwalibog, E.; Jaworski, S.; Jagiello, J.; Winkowska, M.; Szmidt, M.; Wierzbicki, M.; Sosnowska, M.; Balaban, J.; et al.** Effects of Reduced Graphene Oxides on Apoptosis and Cell Cycle of Glioblastoma Multiforme. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3939. <https://doi.org/10.3390/ijms19123939> (IF 4,183; 140 pkt.)
- 2) **Szczepaniak J, Jagiello J, Wierzbicki M, Nowak D, Sobczyk-Guzenda A, Sosnowska M, Jaworski S, Daniluk K, Szmidt M, Witkowska-Pilaszewicz O, Strojny-Cieslak B, Grodzik M.** Reduced Graphene Oxides Modulate the Expression of Cell Receptors and Voltage-Dependent Ion Channel Genes of Glioblastoma Multiforme. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 6;22(2):515. doi: 10.3390/ijms22020515. PMID: 33419226; PMCID: PMC7825604 (IF 6,208; 140 pkt.)
- 3) **Szczepaniak J, Sosnowska M, Wierzbicki M, Witkowska-Pilaszewicz O, Strojny-Cieslak B, Jagiello J, Fraczek W, Kusmierz M, Grodzik M.** Reduced Graphene Oxide Modulates the FAK-Dependent Signaling Pathway in Glioblastoma Multiforme Cells

In Vitro. Materials (Basel). 2022 Aug 24;15(17):5843. doi: 10.3390/ma15175843. PMID: 36079225; PMCID: PMC9457042. (IF 3,748; 140 pkt.)

W trzech publikacjach mgr Jarosław Szczepaniak jest pierwszym Autorem, a deklarowany Jego wkład w przygotowanie opublikowanych prac naukowych, potwierdzony przez pozostałych Współautorów wynosi od **64 do 71 %**. Zadeklarowany procentowy wkład w przygotowanie prac naukowych uważam za realny. Pan mgr Jarosław Szczepaniak uczestniczył w projektowaniu układu doświadczalnego, brała czynny udział w przeprowadzeniu doświadczeń, interpretacji wyników, wykonał analizy statystyczne uzyskanych wyników, napisał publikacje naukowe. Sumaryczny IF czasopism, w których opublikowano prace naukowe wynosi **14,139**, a liczba punktów MEiN wynosi **420**.

Wymienione publikacje uzupełniono polskojęzycznym tekstem obejmującym wstęp s.16-18, który wprowadził czytelnika do problematyki badawczej, hipotezę badawczą, cel i zakres pracy s. 19, opis metodyki badań s. 20-28, omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych s. 29-41, podsumowanie i wnioski s. 41-44 oraz bibliografię s. 45-51. Wymienione rozdziały poprzedzają: streszczenie pracy – polskojęzyczne i anglojęzyczne oraz spis treści s. 9, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską s. 11, wykaz skrótów użytych w rozprawie doktorskiej s. 12-15. Do rozprawy doktorskiej załączono oświadczenia współautorów dotyczące merytorycznego i procentowego ich udziału w spójnym tematycznie zbiorze artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oceniana praca zawiera podstawowe elementy rozprawy doktorskiej, ma charakter naukowo-badawczy, napisana jest poprawnym, naukowym językiem i formalnie odpowiada wymogom zawartym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668).

Ocena merytoryczna

We rozdziale „wstęp” Autor bardzo przekonująco uzasadnia potrzebę podjęcie przeprowadzonych badań. Nakreśla problem dotyczący zapadalności ludzi na nowotwór złośliwy glejaka IV stopnia (GBM), który jest pierwotnym guzem mózgu. Reprezentuje najczęściej występujący nowotwór ośrodkowego układu nerwowego i według klasyfikacji WHO należy do IV klasy zróżnicowania histologicznego. Autor dysertacji podkreśla, że średnia zapadalność na GBM wynosi 3,19 na 100 000 osób rocznie, a średni całkowity czas przeżycia od postawienia diagnozy wynosi ok 15 miesięcy. Z kolei brak sukcesu terapeutycznego przypisuje się wielu czynnikom, w tym szybkiemu naciekaniu komórek guza mózgu, heterogenności wewnątrz guza, ograniczonej dyfuzji leków terapeutycznych przez barierę

kręć-mózg i mięsz/guz mózgu oraz obecności komórek macierzystych (GSC) w guzie, które są odporne na chemio i radioterapię, są zdolne do tworzenia guza i samoodnowy. Autor zaznacza, że wyzwań w zakresie normalizacji komórek glejaka IV stopnia jest wiele, a płatki grafenu oraz pochodne grafenu dzięki unikalnej strukturze i właściwościom fizykochemicznym mogą oddziaływać selektywnie cytotoksycznie hamując mechanizmy migracji i inwazji czy indukując chociażby w komórkach nowotworowych proces apoptozy.

Autor jasno sformułował **hipotezę badawczą**, w której założył, że płatki zredukowanego tlenku grafenu i płatki grafenu, ze względu na dużą powierzchnię właściwą, nanometryczną grubość i obecność grup tlenowych na skutek kontaktu z błoną komórkową modulują procesy komórkowe takie jak apoptoza, proliferacja, adhezja czy mobilność. Z uwagi na odmienną ekspresję receptorów zewnątrzkomórkowych oraz potencjał błony w komórkach prawidłowych i komórkach nowotworowych efekt wywołany przez płatki tlenku grafenu i płatki grafenu nie jest tożsamy. Pomimo faktu, iż przeprowadził łącznie aż 5 doświadczeń postawił podstawowy i wspólny **ceł naukowy** dla badań które przeprowadził: „celem pracy było zbadanie i porównanie wpływu wybranych form alotropowych węgla na toksyczność wobec komórek nowotworowych glejaka IV stopnia oraz związany z tym szlak aktywacji apoptozy, działanie szlaków komórkowych w błonie komórkowej i modulację mechanizmów adhezji”.

Zakres przeprowadzonych badań obejmował: **a)** charakterystykę i porównanie właściwości fizykochemicznych materiałów: morfologia, wielkość, analiza elementarna, rezystancja, widma (Ramana, FTIR, XPS), potencjał zeta; **b)** określenie wpływu wybranych form alotropowych węgla (płatki zredukowanego tlenku grafenu i płatki grafenu) na przeżywalność (cytotoksyczność) i morfologię w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87); **c)** określenie wpływu płatków grafenu i zredukowanych tlenków grafenu o różnym stopniu redukcji w zakresie oceny funkcjonalnej i molekularnej komórek, ze szczególnym uwzględnieniem modulacji szlaków sygnałowych w błonie komórkowej lub bezpośredniej interakcji ze strukturami komórkowymi wrażliwymi na zmiany potencjału elektrochemicznego (kanały jonowe) i receptorami zewnątrzkomórkowymi w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87); **d)** określenie wpływu płatków zredukowanych tlenków grafenu w porównaniu do grafenu w zakresie wpływu modulującego i transdukcyjnego na mechanizm adhezji w komórkach prawidłowych (Hs5) i nowotworowych (U87).

W rozdziale „**metodyka badań**” Autor dokonał charakterystyki materiałów grafenowych, które wykorzystał do badań m.in. płatki zredukowanego tlenku grafenu (rGO): rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD oraz płatki grafenu (GN): GN/ExF, następnie zaprezentował

metodykę badań właściwości fizykochemicznych tych materiałów. Dokonał charakterystyki modeli biologicznych *in vitro* m.in. linie komórkowej glejaka IV stopnia U87-MG(HTB-14) oraz komórek zrębu szpiku o morfologii fibroblastów Hs5 (CRL-11882). W celu określenia wpływu materiałów węglowych (rGO, GN) na funkcjonowanie komórek nowotworowych glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych Hs5 mgr Jarosław Szczepaniak przeprowadził 5 doświadczeń. Celem 1 **doświadczenia** była szczegółowa analiza fizykochemiczna badanych materiałów czyli płatków zredukowanego tlenku grafenu (rGO: rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD) oraz płatków grafenu (GN: GN/ExF). Wyniki z 1 doświadczenia Autor przedstawił w trzech publikacjach naukowych stanowiących spójny tematycznie zbiór artykułów składających się na niniejszej dysertację. Celem 2 **doświadczenia** było określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu (rGO: rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD) i płatków grafenu (GN: GN/ExF) na żywotność komórek glejaka IV stopnia U87 i komórek prawidłowych Hs5. W doświadczeniu 2, wymienione linie komórkowe potraktowano rGO i GN w stężeniach 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml, a testy na żywotność komórek przeprowadzono po 24 h od wprowadzenia badanych materiałów do kultury komórek. Celem 3 **doświadczenia** było określenie wpływu płatków rGO (rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD) i GN (GN/ExF) na parametry morfologiczno-funkcjonalne komórek, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju śmierci komórkowej, poziomu potencjału błony mitochondrialnej oraz przebiegu faz cyklu komórkowego. Podobnie jak w doświadczeniu 2 linie komórkowe potraktowano rGO i GN w stężeniach 5, 10, 25, 50, 100 µg/ml, a testy wykonano po 24 h od wprowadzenia badanych materiałów do kultury komórek. Celem 4 **doświadczenia** było określenie zmian zachodzących w błonie komórkowej pod wpływem działania płatków zredukowanego tlenku grafenu o różnej zawartości grup tlenowych w porównaniu do płatków grafenu w komórkach glejaka IV stopnia U87 i komórkach prawidłowych Hs5 *in vitro*. W doświadczeniu 4, linie komórkowe potraktowano rGO (rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD) i GN (GN/ExF) w stężeniu 25 µg/ml, a właściwe testy przeprowadzono po 24 h od wprowadzenia badanych materiałów do kultury komórek. Celem 5 **doświadczenia** było określenie wpływu płatków zredukowanego tlenku grafenu rGO (rGO/ATS, rGO/Term, rGO/TUD) w porównaniu z płatkami grafenu GN (GN/ExF) na procesy adhezji i migracji w komórkach glejaka IV stopnia U87 i komórkach prawidłowych Hs5. Podobnie jak w doświadczeniu 4, linie komórkowe potraktowano materiałami badanych form grafenu w stężeniu 25 µg/ml, a właściwe testy przeprowadzono po 24 h od wprowadzenia badanych materiałów do kultury komórek.

Poprawnie zaplanowany model badań, a także szeroki zakres i kompleksowość przeprowadzonych analiz w pełni pozwoliły na wiarygodną weryfikację postawionej hipotezy

i celu badań. Autor w sposób bardzo syntetyczny zrekapitulował najważniejsze wyniki badań, kilkakrotnie po omówieniu najważniejszych wyników dokonał bardzo trafnych i syntetycznych podsumowań.

W podsumowaniu części opisowej (polskojęzycznej) rozprawy Autor sformułował 5 wniosków końcowych oraz podsumowanie znajdujące odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań.

Autor ustalił, że

1. Zastosowanie różnych metod produkcji (chemiczne/fizyczne) zredukowanych tlenków grafenu pozwoliło na uzyskanie materiałów o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i biologicznych w stosunku do komórek nowotworowych glejaka IV stopnia.
2. Płatki grafenu oraz zredukowanych tlenków grafenu poprzez tendencję do przyłączania do błony komórek glejaka IV stopnia U87 *in vitro* wywołują efekt cytotoksyczny związany ze spadkiem aktywności metabolicznej i w konsekwencji aktywacja apoptozy na drodze zależne od wewnątrzkomórkowego szlaku mitochondrialnego.
3. Płatki grafenu i jego pochodne wpływają na ekspresję genów kanałów jonowych zależnych od napięcia, uczestniczących w elektro-chemicznych szlakach sygnałowych w komórkach glejaka IV stopnia linii U87, odpowiedzialnych za napływ jonów sodu i alkalizację cytoplazmy, co może doprowadzić do aktywacji apoptozy w komórkach.
4. Obniżenie ekspresji białka uPar oraz endogliny (CD105) oraz zwiększenie ekspresji na poziomie mRNA integryny $\alpha 5$ i na poziomie białka integryny $\beta 1$ i spadek ekspresji β -kateniny na poziomie mRNA i białka w komórkach glejaka linii U87 po traktowaniu płatkami grafenu może być mechanizmem stymulującym adhezję komórek i prowadzić do zmniejszenia migracji komórek nowotworowych.
5. Płatki zredukowanego tlenku grafenu obniżają ekspresję białka FAK w komórkach glejaka IV stopnia, co może wpływać na obniżenie proliferacji i migracji tych komórek.

Jak podkreśla kandydat do stopnia doktora przeprowadzone badania poszerzyły ogólną wiedzę na temat mechanizmu funkcjonalnego płatków grafenu i jego pochodnych. Podkreślił, że badane materiały nie są selektywne w stosunku do komórek nowotworowych i oddziałują podobnie z komórkami prawidłowymi, chociaż siła tego oddziaływania jest słabsza lub nawet ma odwrotny efekt. Ciekawym ustaleniem jest stwierdzenie, że obecność grup funkcyjnych

zawierających tlen (ich liczba i rodzaj) czyni je bardziej funkcjonalnymi i może być cechą determinującą ich przyszłe zastosowanie w medycynie klinicznej. Szkoda jednak, że nie udało się Autorowi badań ustalić który z czterech badanych materiałów można wytypować jako najlepszy, a zatem nasuwa się pytanie czy doktorant zamierza kontynuować badania, które mogłyby w przyszłości zweryfikować ten niedostatek wiedzy??. Ponadto w najnowszej literaturze pojawiają się doniesienia, że komórki odpornościowe znajdujące się w guzie stanowią główną przyczynę, dla której leczenie glejaka jest tak trudne. Okazuje się, że komórki wrodzonego układu odpornościowego zamiast organizmu chronią nowotwór- rodzi się zatem pytanie: czy w kontekście tej wiedzy wykorzystanie płatków grafenu jako czynnika oddziałującego na komórki systemu odpornościowego może być potencjalnym kierunkiem dalszych badań nad tym materiałem? - publiczna obrona będzie dobrą okazją do dyskusji na ten temat.

Podsumowanie

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam dysertację doktorską mgr Jarosława Szczepaniaka. Kompleksowy, szeroki zakres badań przedstawionych w rozprawie wymagał bardzo dobrej znajomości podjętej problematyki oraz dużego nakładu pracy. Autor wywiązał się z tego znakomicie. Zaproponowane i wykonane badania, a w szczególności uzyskane wyniki badań są nowym narzędziem pozwalającym uzyskać cenne informacje na temat biologii śmiertelnego guza mózgu. O wysokiej wartości naukowej uzyskanych wyników świadczy ich opublikowanie w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym, co stwarza duże szanse na wielokrotne ich cytowania. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Nauki Biologiczne SGGW w Warszawie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Szczepaniaka.

Reasumując stwierdzam, że oceniana praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Dlatego też, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Jarosława Szczepaniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Ogmiła