



WYDZIAŁ
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dn. 14 luty 2025 r.

dr hab. Ireneusz Piwoński, prof. UŁ
Katedra Technologii i Chemii Materiałów
Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki

RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego pt.:

„Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek ssaczych”

wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki - Promotora oraz Pani dr inż. Agnieszki Żuchowskiej - Promotora pomocniczego, zrealizowanej w Katedrze Biotechnologii Medycznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Ocena wyboru tematyki badań

Tematyka recenzowanej pracy dotyczy określenia oddziaływań zachodzących między płatkami grafenu utlenionego o różnej wielkości a wybranymi typami komórek ssaczych. W ostatnich latach badania nad nanomateriałami, w tym nanomateriałami węglowymi, w powiązaniu z układami biologicznymi cieszą się niestąbnącym zainteresowaniem. Podyktowane jest to potrzebą poszerzania wiedzy dotyczącej metod syntezy i właściwości fizykochemicznych różnych typów nanomateriałów oraz poszukiwania nowych obszarów ich zastosowań. Istotną kwestią jest też dostosowanie specyfiki badań do opracowywanych regulacji prawych odnoszących się do nanotechnologii i formułujących reguły wytwarzania oraz stosowania nanomateriałów z uwzględnieniem aspektów ochrony środowiska i zdrowia ludzi. Badania nad zastosowaniem nanomateriałów w biologii i medycynie są bardzo obszerne. Podyktowane jest to chęcią opracowywania urządzeń zawierających nanosensory o charakterze chemicznym lub biologicznym, mogące służyć do diagnozowania schorzeń, w tym nowotworów z możliwością selektywnego kierowania leków lub znaczników do komórek zaatakowanych przez chorobę. Minimalizuje się wówczas wpływ skutków ubocznych leku na inne części organizmu. W ten obszar wpisuje się Praca doktorska Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego, której celem było określenie wpływu takich parametrów jak wielkość płatków grafenu utlenionego, kontakt z surowicą ludzką oraz rodzaj hodowli (warunki standardowe/mikrosystem przepływowy) na efektywność wnikania płatków grafenu utlenionego do wybranych typów komórek. Uwagę przyciągają w pierwszej kolejności dwa elementy. Pierwszy związany jest z zaplanowaniem badań w warunkach zbliżonych do tych, które panują w organizmie ludzkim. Drugim składnikiem, który niewątpliwie stanowi o innowacyjności przedstawionych badań jest próba skonfrontowania wyników badań



uzyskanych na hodowlach stacjonarnych z badaniami otrzymanymi w warunkach przepływowych z zastosowaniem mikrosystemów. Ponadto uwzględnienie wpływu surowicy ludzkiej na zachowanie się płytek grafenu utlenionego na komórki stanowią również ciekawy wątek pracy, zbliżający badany układ do warunków panujących w organizmie. Do badań wybrano ludzkie linie komórkowe: gruczolaka płuc (A549) - komórki nowotworowe, fibroblasty wyizolowane z tkanki płucnej (LL-24), oraz komórki nabłonkowe żyły pępowinowej (HVEC). Wybór tych linii w powiązaniu z wcześniej wymienionymi parametrami wskazuje na ambitny cel jaki postawił przed sobą Doktorant oraz szeroki zakres prac niezbędny do scharakteryzowania przedmiotu badań. Ważne jest bowiem nie tylko jak płytki grafenu utlenionego będą oddziaływać z różnymi komórkami, ale również ze zdrowymi i nowotworowymi komórkami tego samego typu.

Podjęty przez Doktoranta temat pracy jest zatem aktualny, oryginalny i bardzo znaczący, mając na uwadze potencjalne długofalowe oddziaływanie nanomateriałów na komórki ludzkie z uwzględnieniem potencjalnych aplikacji. Przede wszystkim zaś wpisuje się w toczoną dyskusję naukową dotyczącą określenia pozytywnego lub negatywnego wpływu grafenu utlenionego na organizm ludzki.

Ocena merytoryczna dysertacji

Recenzowana praca doktorska została wydana w wygodnej i atrakcyjnej formie monografii i stanowi klasyczną dysertację liczącą 145 stron. Układ pracy jest więc również klasyczny i obejmuje część literaturową, część doświadczalną oraz opis wyników i wnioski. Część literaturowa wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z charakterystyką grafenu utlenionego, hodowli komórkowych oraz badań grafenu utlenionego w powiązaniu z różnymi rodzajami komórek oraz jego zastosowania w wybranych typach terapii. Bibliografia liczy 120 pozycji literaturowych. Do pracy załączono także dorobek naukowy Doktoranta liczący trzy publikacje z czasopism z listy JCR związane z tematyką badawczą, w których Doktorant jest pierwszym Autorem oraz cztery inne publikacje (również z list JCR), które nie są związane z tematyką dysertacji. Doktorant uczestniczył również w jednej w konferencji naukowej oraz otrzymał nagrodę Rektora. Elementy te wymieniam z zaznaczeniem, że nie stanowią one przedmiotu oceny niniejszej dysertacji. Pewnym mankamentem pracy doktorskiej jest jej tytuł. Sugeruje on bowiem, że możemy spodziewać się opisu badań komórek pochodzących od różnych ssaków, podczas gdy przedstawione w pracy badania dotyczą jedynie komórek ludzkich. Z tego względu uważam, że tytuł np. „*Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do wybranych typów komórek ludzkich*” byłby bardziej odpowiedni.

W części literaturowej dokładnie opisano i scharakteryzowano wady i zalety hodowli w układach stacjonarnych oraz przepływowych. Za szczególnie interesujący uważam rozdział dotyczący badań wnikania grafenu utlenionego do komórek. Dokładnie zilustrowano również mechanizmy endocytozy. Analizując omówienie części literaturowej należy podkreślić staranne omówienie typów hodowli komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem hodowli *Cell-on-a-Chip*, ze wskazaniem wad i zalet obu metod. Rodzi się tu pytanie, czy otrzymane w laboratorium układy przepływowe stanowią element nowości czy też są tylko powieleniem układów stosowanych na świecie? Również podrozdział dotyczący mechanizmów wnikania grafenu utlenionego do komórek jest bardzo dobrze opisany. Omówienie kierunków wykorzystania grafenu utlenionego zostało zilustrowane na przykładzie zastosowań w chemioterapii, terapii genowej, terapii fotodynamicznej oraz teranostyce.



Badania przedstawione w tej części koncentrują się jednak na innych typach komórek niż te, które zostały wybrane do dalszych badań. Niemniej, opis linii komórkowych zawarty w rozdziale 3.2 (str. 69) wraz z dołączonymi argumentami uzasadniającymi ich wybór nie pozostawia wątpliwości, że został on dokonany logicznie i prawidłowo.

Część doświadczalną, będącą najbardziej obszerną częścią pracy, otwiera opis metodyki badań, opisy przygotowywania hodowli oraz podanie dokładnych procedur badania cytotoksyczności grafenu utlenionego (aktywność metaboliczna, ocena żywotności komórek) oraz jego wnikania do komórek. Materiały i metody badań zostały opisane bardzo dobrze. Dokładnie opisano protokoły pozwalające na określenie efektywności wnikania utlenionego grafenu do komórek, procedury badania jego lokalizacji w hodowlach standardowych oraz przepływowch, a także protokoły służące do określenia mechanizmów wnikania grafenu utlenionego do komórek. Dobry opis procedur doświadczalnych jest istotny w przypadku potrzeby ich ponownego zastosowania do dalszych badań (powtarzalność wyników) i stanowią silną stronę dysertacji.

Wybrany do badań biologicznych grafen utleniony został scharakteryzowany metodami głównie mikroskopowymi i spektroskopowymi. Nie zawarto natomiast informacji jaką metodą został otrzymany. Czy była to metoda Hummers'a, Tour'a, Brodie'go, Staudenmaier'a czy inna? Różnią się one warunkami i jest to o tyle ważne, że silne kwasy i inne substancje utleniające wykorzystywane w syntezie mogą powodować efekty uboczne lub wpływać niekorzystnie na wyniki dalszych badań. Badania mikroskopowe niebicie wskazują, że mamy do czynienia z dwuwymiarowym materiałem węglowym. Natomiast widma w podczerwieni pokazują, że mamy do czynienia z grafenem utlenionym a zatem z płatkami węglowymi zawierającymi na swojej powierzchni kilka typów tlenowych grup funkcyjnych. Z kolei badania Ramana zostały wykonane w celu określenia zmian strukturalnych. Autor stwierdza, że otrzymane wyniki wskazują na destrukcyjny wpływ enzymów i innych składników surowicy na strukturę grafenu utlenionego. W moim odczuciu jest to zbyt daleko idący wniosek. Owszem, widać zmiany zachodzące pod wpływem surowicy, ale raczej nie są one destrukcyjne. Wyjaśnienia wymaga zastosowanie techniki DLS do określenia rozmiaru płatków w powiązaniu z metodą filtracji. Ze względu na możliwość deformacji płatków lub nawet zwijania się w nanorurki mogą one przenikać przez filtr. Z drugiej strony DLS może pokazywać większe niż rzeczywiste rozmiary ze względu na możliwość oddziaływania tlenowych grup funkcyjnych i tworzenia aglomeratów. Być może rozwiązaniem byłoby zastosowanie innej metody rozdziału płatków prowadzące do otrzymania frakcji o bardziej jednorodnym rozmiarze (np. wirowanie lub sedymentacja) z jednoczesnym zastosowaniem próbek wzorcowych do badań DLS. Być może występuje tu także efekt ekranowania sygnału od małych płatków przez duże aglomeraty grafenu utlenionego lub inne efekty. Niemniej, wątek ten jest interesujący i w moim odczuciu powinien być przebadany bardziej szczegółowo, ze względu na jego wpływ na interpretację wyników przedstawionych w dalszej części dysertacji. W ewentualnych dalszych badaniach rozważyłbym zatem inne metody rozdziału płatków grafenu utlenionego oraz zastosowanie dodatkowych metod pomiarowych - np. mikroskopu sił atomowych AFM. Niemniej, wybór technik badawczych do wstępnej charakterystyki nanomateriału uważam za zasadny i wystarczający na tym etapie badań. Poważnym mankamentem pracy jest natomiast brak wykazu skrótów i symboli co stanowi utrudnienie w poruszaniu się po pracy zwłaszcza, że Autor operuje wieloma symbolami i skrótami, które są trudne do rozszyfrowania podczas wstępnej lektury pracy. W pierwszej części pracy daje się również zauważyć brak zgodności numeracji rysunków (rycin) z numeracją stosowaną w tekście (do ryc. 12).



Cel ogólny pracy oraz cele szczegółowe zostały wyraźnie opisane. Zabrakło natomiast wyraźnego wyeksponowania tezy lub hipotezy badawczej, która w klasycznych dysertacjach stanowi centrum dyskusji naukowej i którą, poprzez zaplanowane i wykonane eksperymenty, Autor pracy stara się zweryfikować. Zauważyć jednak należy, że pewne hipotezy znajdują się w dalszych fragmentach pracy, zaś Autor podejmując dyskusję stara się je udowodnić. Postawione przez Doktoranta pytania też w sumie można potraktować jako formę hipotezy badawczej.

Struktura pracy w pełni spełnia wymagania redakcyjne oraz merytoryczne stawiane dysertacjom. Cele pracy są bezpośrednio związane z wyzwaniem jakie postawił przed sobą Doktorant i które koncentrują się wokół odpowiedzi na pytania dotyczące wpływu wielkości płatków grafenu utlenionego oraz jego kontaktu z surowicą na efektywność wnikania w zależności od typu komórek, a także jaka jest jego lokalizacja w komórkach. Badania te mają znaczenie poznawcze i aplikacyjne oraz są właściwie sformułowane. Podsumowując stwierdzam, że ta część pracy w mojej opinii jest bardzo dobrze opracowana.

Autor w rozdziale 3.3.1. – 3.3.2 przedstawił wyniki efektywności wnikania grafenu utlenionego do komórek z zastosowaniem cytometru przepływowego. Proszę o komentarz czy zamieszczone wyniki dotyczą całej frakcji komórek, czy też zostały wybrane na podstawie kryteriów wielkości (*FCC - forward scatter*) czy granularności (*SSC - side scatter*). Czy była podjęta próba odpowiedzi, które składniki surowicy są odpowiedzialne za wzrost lub osłabienie internalizacji płatków grafenu utlenionego? – str. 88. Poszczególne rozdziały Doktorant często podsumowuje podrozdziałem „Wnioski”. W moim odczuciu mają one raczej charakter dyskusji, zwłaszcza, że Autor odnosi się do innych prac i je cytuje.

Myślę, że elementem najbardziej skłaniającym do dyskusji są badania dotyczące określenia szlaków wnikania utlenionego grafenu do komórek. Autor wprawdzie zastrzega, że nie był to główny cel pracy, ale zauważa również, że otrzymane wyniki wydają się sprzeczne i niejednoznaczne. Moim zdaniem, przyczyną uzyskania niejednoznacznych wyników może być brak wykorzystania metod statystycznych, zwłaszcza określenia istotności statystycznej, która w badaniach biologicznych jest bardzo ważnym kryterium. Chodzi tu głównie o wyniki przedstawione na rys. nr 34 - 38. Autor nie zawarł też informacji, czy przedstawione na wykresach słupki błędów to błąd średni czy może odchylenie standardowe oraz z ilu pomiarów uzyskano wynik (jakie jest n ?). Drugą możliwą przyczyną otrzymania niejednoznacznych wyników może być wspomniana wcześniej niewystarczająca homogeniczność rozkładu wielkości płatków frakcji grafenu utlenionego i związane z tym efekty pochodzące od płatków o różnej wielkości. Brak również dyskusji, które z grup tlenowych są bardziej, a które mniej odpowiedzialne za oddziaływanie z komórkami.

Za najbardziej ciekawe uważam badania w warunkach przepływowych z zastosowaniem mikroukładów *Cell-on-a-Chip*. Autor podkreśla, że nie odnaleziono raportów literaturowych dotyczących zastosowania mikrosystemów przepływowych do oceny wnikania grafenu utlenionego do komórek ssaczych, co wskazuje, że jest to element nowości. Mocną stroną tych pomiarów jest to, że umożliwiają one prowadzenie badań z wykorzystaniem kokultur komórkowych w warunkach przepływowych. Autor podsumowuje wyniki eksperymentów prowadzonych w warunkach stacjonarnych i przepływowych w tabeli II. Uważam jednak, że tabela ta powinna być bardziej rozbudowana, aby lepiej unaocznic różnice w zachowaniu się grafenu utlenionego w obu typach warunków. Autor wspomina w rozdziale 3.6.3, że przyczyną zwiększonej internalizacji grafenu utlenionego w warunkach przepływowych w stosunku do warunków standardowych jest wzmożenie



procesów przenoszenia masy. Czy były próby określenia tego parametru w sposób ilościowy? Rodzi się też pytanie, w jaki sposób charakter przepływu tj. przepływ laminarny lub burzliwy (liczba Reynoldsa), wpływałby na efektywność wnikania i lokalizację grafenu utlenionego w komórkach? Czy są jakieś dane na ten temat i czy była podjęta próba określenia charakteru przepływu w badanych układach?

Przedstawione komentarze nie umniejszają zdecydowanie pozytywnego odbioru pracy, zawierającej wiele cennych i nowatorskich rozwiązań. Badania te uważam za potrzebne, ważne i wnoszące wiele cennych informacji do obszaru wiedzy z zakresu biotechnologii i nanotechnologii. Za szczególnie cenne uważam pomiary w warunkach przepływowych z wykorzystaniem kokultur komórkowych. Mimo kilku uchybień językowych i edytorskich lektura pracy pozostawia zdecydowanie pozytywne wrażenie.

Stwierdzam, że przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej treści prezentują teoretyczną wiedzę doktoranta niezbędną do ubiegania się o nadanie stopnia doktora. Wyrazem tego są dobrze zaplanowane badania, właściwe przeprowadzenie przeglądu literaturowego oraz odpowiedni wybór technik i metod badawczych. Ponadto, zaprezentowane wyniki wskazują, że Doktorant wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej tj. planowania, obserwacji i właściwego wyciągania wniosków. Rozprawa doktorska stanowi także oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, na co wskazują otrzymane wyniki badań własnych.

Wnioski końcowe

Podsumowując, wysoko oceniam dokonania Doktoranta oraz jakość pracy doktorskiej Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego pod tytułem „*Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek ssaczych*” zrealizowanej pod opieką Promotora Pana prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki oraz Pani dr inż. Agnieszki Żuchowskiej - Promotora pomocniczego. W recenzowanej pracy Doktorant dowiódł swojej szerokiej wiedzy teoretycznej i praktycznej w dyscyplinie biotechnologia. Dzięki umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w oparciu o właściwie dobrany zakres metod badawczych, poprawnie sformułował i finalnie rozwiązał oryginalny problem naukowy. Uzyskane wyniki badań zostały właściwie opracowane, zinterpretowane i opisane. Przedstawione w recenzji uwagi mają głównie charakter dyskusyjny, zaś zauważone niedoskonałości nie wpływają negatywnie na zdecydowanie dobrą ocenę osiągnięcia naukowego Doktoranta.

W związku z powyższym stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w **art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022, poz. 574)** i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego do publicznej obrony pracy doktorskiej.



Dr hab. Ireneusz Piwoński

