



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

prof. dr hab. n.med. Jolanta Kaszuba-Zwoińska  
Katedra Patofizjologii  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Wydział Lekarski  
[Jolanta.kaszuba-zwoinska@uj.edu.pl](mailto:Jolanta.kaszuba-zwoinska@uj.edu.pl)

Kraków, dnia 24.02.2025r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek ssaczych” napisanej przez Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego**

Recenzję sporządzono w odpowiedzi na pismo z dn. 10 grudnia 2024r. Pana prof. dr hab. inż. Michała Chudego, Przewodniczącego Naukowej Dyscypliny BIOTECHNOLOGIA w Politechnice Warszawskiej, informujące o powołaniu mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego. Przedmiotem merytorycznej oceny jest przekazana mi z w/w pismem rozprawa doktorska.

Praca doktorska zatytułowana „Badania nad wnikaniem utlenionego grafenu do komórek ssaczych” przedłożona do recenzji w formie monografii, była realizowana w Katedrze Biotechnologii Medycznej, na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej przez Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego. Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka, a promotorem pomocniczym Pani dr inż. Agnieszka Żuchowska.

Tematyka badawcza jest związana z poszukiwaniem nowych nośników terapeutycznych, które byłyby wykorzystywane w medycynie, zapewniając selektywne uwalnianie leku lub uzyskiwanie efektu synergistycznego w terapii. Dotychczasowe wyniki badań nad nośnikami leków nie przełożyły się na ich praktyczne zastosowanie w medycynie. Utleniony grafen (GO) jest pochodną grafenu bogatą w tlenowe grupy funkcyjne, posiada dużą powierzchnię właściwą i możliwości modyfikacji powierzchni, dzięki czemu może być potencjalnym nośnikiem leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej czy terapii genetycznej. Wybór tematyki badawczej jest więc zasadny i ma potencjalne implikacje biotechnologiczne, medyczne i terapeutyczne. Aby utleniony grafen znalazł zastosowanie w medycynie jako nośnik leków, niezbędne jest zbadanie jego właściwości biologicznych, związanych z oddziaływaniem GO na komórki, jego drogami wnikania do komórek, efektami indukowanymi obecnością GO na powierzchni lub wewnątrz komórki, a także wpływem surowicy jako płynu ustrojowego na te właściwości utlenionego grafenu.

Praca doktorska jest oparta na badaniach eksperymentalnych prowadzonych na ludzkich liniach komórkowych, jednej nowotworowej - A549 - gruczolakoraka płuc i dwóch prawidłowych: linii LL-24, będącej fibroblastami, wyizolowanymi z płuc i linii HUVEC, pochodzącej z nabłonka żyły pępowinowej. Wszystkie linie komórkowe były komercyjnie dostępne. Modelem badań były hodowle

**Katedra Patofizjologii**

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: [patofizjo@cm-uj.krakow.pl](mailto:patofizjo@cm-uj.krakow.pl)  
[www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl](http://www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl)



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

komórkowe: standardowe 2D i nowatorska hodowla w mikrosystemie Cell-on-a-chip, statyczna i przepływowa opracowana do badania wnikania GO do komórek ludzkich.

Monografia pod względem redakcyjnym składa się z czterech głównych rozdziałów, zawartych na 142 stronach pracy. Główne rozdziały monografii to:

- I. Część literaturowa
- II. Część doświadczalna
- III. Podsumowanie i wnioski końcowe
- IV. Bibliografia

Rozdziały I-III posiadają sekwencyjnie ułożone podrozdziały, rozdział IV – Bibliografia – jest złożona z 120. angielskich pozycji literaturowych, opublikowanych w latach 1998-2023, powiązanych z tematyką doktoratu. Pod względem edytorskim układ pracy odbiega od standardowego schematu. Podrozdziały części III – Wyniki, raz zawierają podsumowanie i wnioski, innym razem dyskusję i wnioski lub same wnioski. Monografia zawiera 62 ryciny i 11 tabel, streszczenie, abstrakt angielski, informację o dorobku naukowym Doktoranta i podziękowania.

W informacji o dorobku naukowym Doktoranta na uwagę zasługują trzy angielskie publikacje, ze wskaźnikiem oddziaływania, opublikowane w czasopiśmie wydawnictwa ELSEVIER w latach 2023-2024, z pierwszym autorstwem Doktoranta. Dwie publikacje są oryginalne, jedna jest pracą przeglądową; wszystkie są spójne tematycznie i w mojej ocenie mogły by stanowić osiągnięcie naukowe na podstawie monotematycznego cyklu publikacji.

W swojej recenzji odniosę swoje uwagi do poszczególnych rozdziałów monografii. Część literaturowa rozpoczyna się wyodrębnionym wstępem, który wprowadza do tematyki i charakteryzuje utleniony grafen i grafen, porównując ich właściwości fizykochemiczne i wynikające z nich potencjalne zastosowania w wielu dziedzinach, zwłaszcza biomedycznych. W dalszej części Autor koncentruje się na omówieniu na podstawie literatury właściwości i zastosowania GO w biomedycynie, poświęcając swoje rozważania hodowli komórkowej, jako modelowi eksperymentalnemu, porównując hodowlę komórkową standardową w monowarstwie (2D) z hodowlą przestrzenną (3D). Nowatorskim kierunkiem prowadzenia hodowli jest wykorzystanie mikrosystemów przepływowych do hodowli komórek, czyli hodowli w mikrosystemie, określanej z angielskiego terminem Cell-on-a-Chip.

Otrzymywanie mikrosystemów jest opisane w części literaturowej z uwzględnieniem procedur ich wytwarzania i funkcjonowania. Ten typ hodowli komórkowej w skali mikro ma zastosowanie w badaniach prowadzonych w realizacji doktoratu.

Ważnym aspektem merytorycznym jest uwzględnienie przez Autora modyfikacji chemicznych utlenionego grafenu, co zwiększa jego biokompatybilność i dołączanie leków, zwłaszcza tych o działaniu przeciwnowotworowym – cytotoksycznym czy antyproliferacyjnym. GO jako nośnik leków może być wzbogacony o cząsteczki, które zwiększają jego dostarczenie do komórek docelowych wykorzystując oddziaływanie ligand - receptor, co znajduje implikacje w chemioterapii.

Oprócz chemioterapii GO znajduje zastosowanie jako nośnik kwasów nukleinowych w terapiach genowych.

Utleniony grafen może być zastosowany jako nośnik fotouczulaczy w terapii fotodynamicznej, co prowadzi do syntezy reaktywnych form tlenu, odpowiedzialnych za stres oksydacyjny i śmierć komórki,

Katedra Patofizjologii

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl

www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

co ma szczególne znaczenie w przypadku komórek nowotworowych i opracowywanych terapii przeciwnowotworowych.

GO znajduje zastosowanie już na etapie diagnozowania nowotworu w teranostyce, która łączy diagnostykę obrazowania różnymi technikami obrazowania z jednoczesną terapią przeciwnowotworową. Analizując wyniki badań eksperymentalnych Doktorant zwraca uwagę na potencjał terapeutyczny i diagnostyczny utlenionego grafenu i perspektywy jego wykorzystania w medycynie.

Kluczowym aspektem dla aktywności GO są drogi jego wnikania do komórek - różne szlaki endocytozy, makropinocytoza i fagocytoza, wielkość płatków grafenu, jego modyfikacje chemiczne, a także typ komórki, do której wnika .

Podsumowując I rozdział monografii – Część literaturową - stwierdzam, że jest on napisany w sposób zrozumiały i rzetelny, uwzględnia w opisie informacje merytoryczne wprowadzające do części badawczej doktoratu, uzasadniając celowość prowadzenia dalszych badań eksperymentalnych nad GO.

Rozdział II – Część doświadczalna obejmuje:

1. Cel pracy; 2. Materiały i metody badań; 3. Wyniki.

Autor jako cele szczegółowe doktoratu, przedstawia pozyskanie wiedzy na temat wnikania utlenionego grafenu do komórek ssaczych w zależności od wielkości płatków GO, jego kontaktu z surowicą ludzką, typu komórki – prawidłowa, nowotworowa oraz rodzaju hodowli: standardowa /w mikrosystemie Cell-on-a –Chip, hodowla statyczna/przepływowa.

Stwierdza, że pomimo wielu opublikowanych wyników badań, żaden nośnik leków ani terapia z użyciem GO nie przeszła do etapu badań przedklinicznych, co stanowi argument przemawiający za potrzebą i celowością prowadzenia badań nad utlenionym grafenem. Nowatorski charakter badań przejawia się w wykorzystaniu komórkowego modelu badań opartego na technologii Cell-on-a –Chip do oceny internalizacji utlenionego grafenu do komórek ssaczych, co zawarte jest w temacie doktoratu.

W mojej ocenie pojęcie „komórek ssaczych” jest nieadekwatne do przeprowadzonych badań z udziałem trzech wymienionych linii komórkowych, ponieważ badania były prowadzone wyłącznie na ludzkich komórkach.

Rozdział II – Materiały i metody – wykazuje szereg niedoprecyzowań;

Zaczynając od odczynników:

- Surowica ludzka (BIOWEST, ang. Human Serum AB male); czy była to surowica inaktywowana cieplnie, czy była wolna od LPS?

- Sterylna woda; czy była to woda destylowana, dejonizowana/demineralizowana?

W części opisującej „Fracjonowanie i przygotowanie próbek”, ale także we wszystkich innych procedurach związanych z wirowaniem zawartych w pracy, prędkości wirowania próbek jest wyrażana obrotach na minutę (RPM) bez uwzględnienia promienia rotora, zamiast parametru

RCFx g, który uwzględniającą promień rotora w przedstawianej wartości i jest wartością porównywalną niezależnie od typu rotora.

W metodyce opisującej inkubację frakcji GO2 i GO4 z surowicą ludzką brak wskazania temperatury inkubacji.

Katedra Patofizjologii

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: [patofizjo@cm-uj.krakow.pl](mailto:patofizjo@cm-uj.krakow.pl)

[www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl](http://www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl)



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Sekcja „Rutynowa hodowla komórkowa” w rozdz. 2.2. jest określeniem kolokwialnym, nie jedynym w tej części metodyki, medium do hodowli komórek HUVEC jest opisane: „Medium hodowlane komórek HUVEC: EGM-2, 1 fiołka suplementu dostarczana przez producenta”, gdzie laboratoryjne, potoczne określenie „fiołka” oznacza zestaw konkretnych suplementów dodawanych do hodowli komórek tej linii.

Kontynuując omówienie warunków hodowli komórkowej, Autor nie uwzględnił nigdzie w opisie procedur hodowlanych parametru wilgotności, co obok temperatury i poziomu CO<sub>2</sub> jest niezbędne do prowadzenia hodowli komórkowej.

Metodyka „Przygotowanie mikroukładu do badań” przedstawia sposób przygotowania sterylnego mikroukładu do hodowli komórkowej; pojęcie sterylności układu jest równoznaczne w tym przypadku z odkażeniem alkoholem etylowym o nieokreślonej procentowości. Taki sposób przygotowania naczyń hodowlanych nie oznacza, że jest ono sterylne i wolne od RNaz, DNaz, RNA, DNA drobnoustrojów, co jest zagwarantowane w standardowych, komercyjnych naczyniach do hodowli komórkowych.

Sekcja „Określenie aktywności metabolicznej” zawiera stwierdzenie:

„Intensywność fluorescencji rezazuryny jest miarą aktywności metabolicznej komórek.” To rezorufina wykazuje właściwości fluorescencyjne, co Autor zdanie wcześniej stwierdza.

W tej części metodyki, Doktorant w opisie hodowli komórkowej wskazuje stężenia frakcji GO stosowane w badaniach jako 50 i 100 µg/ml zawieszane w mediach hodowlanych. Nie określa, czy jest to stężenie wyjściowe, czy końcowe w próbce, co ma kluczowe znaczenie dla oddziaływania płatków, zważywszy, że hodowle były prowadzone w różnych objętościach. Ta uwaga opisu ilościowego dotyczy wszystkich procedur badawczych z frakcjami GO. Kolejna uwaga krytyczna, dotyczy braku opisu powtarzalności przeprowadzonych eksperymentów, praca nie zawiera informacji w ilu powtórzeniach były przeprowadzone eksperymenty na każdej z linii komórkowych i jaka była powtarzalność próbek w eksperymencie.

W sekcji „Ocena żywotności komórek ” brak podania informacji o liczbie zliczanych komórek przy oznaczaniu ich żywotność w mikroskopie fluorescencyjnym.

Kończąc recenzję podrozdziału 2. Materiały i metody badań, stwierdzam brak sekcji poświęconej analizie statystycznej wyników, stosowanych testach statystycznych, co świadczy o jakości i znamienności uzyskanych wyników, chociaż pracy występują wartości SEM i SD w prezentowanych tabelach, czy wykresach.

Przechodząc do podrozdziału 3. Wyniki, punkt 3.1.3. rysunek 23 opisany „Ryc. 23 A) Dekonwolucja widm Ramana dla próbki nieinkubowanej z surowicą. B) Dekonwolucja widm Ramana dla próbki inkubowanej z surowicą. C) Wartości stosunków pasm G i D oraz intensywność pasma D3 dla obu próbek.”; w części graficznej A i B przedstawia intensywność fluorescencji pochodzącą od pasma D3 dla grafenu inkubowanego i nieinkubowanego z surowicą, co przedstawiają wartości liczbowe w tabeli, będącej częścią C tej grafiki. Wartości liczbowe przedstawiające intensywność pasma D3 dla wymienionych próbek wydają się być zamienione.

Doktorant analizując wpływ surowicy ludzkiej inkubowanej z płatkami GO, stwierdził występowanie samoistnych modyfikacji GO w wyniku tych oddziaływań, przeprowadził badania cytotoksyczności i wpływu GO na aktywność metaboliczną badanych linii komórkowych. Najbardziej spektakularny

Katedra Patofizjologii

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl

www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl





UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

wydaje się efekt uzyskany obniżenia aktywności metabolicznej komórek linii nowotworowej A549 inkubowanych z GO4 w porównaniu do aktywności metabolicznej próby kontrolnej. Rysunek 24 przedstawia aktywność komórek linii A549, posiada naniesione znamienności, ale analizowane statystycznie są tylko wartości próbek dla czasu 48h i 72h inkubacji komórek z GO, brak analizy statystycznej i jej oznaczeń między próbkami 0h – 48h, 0h-72h dla GO preinkubowanego i nieinkubowanego z surowicą. Ta uwaga dotyczy też analizy wyników badania aktywności metabolicznej dla komórek linii LL24 i HUVEC. W przypadku linii HUVEC przedstawione wyniki nie wykazują jakiegokolwiek znamienności statystycznej.

Dyskutując uzyskane wyniki w podrozdziale 3.2.3 z danymi literaturowymi i wskazując na rozbieżności w wynikach badań między zespołami badawczymi, należy uwzględnić, że nawet linia nowotworowa jest homogenna przez określoną liczbę pasażów, po tym czasie ulega modyfikacjom, staje się heterogenna, dotyczy to również immortalizowanych linii wyprowadzonych z komórek prawidłowych, co powinno się brać pod uwagę przy planowaniu i prowadzeniu badań na liniach komórkowych.

Do oceny wnikania GO do komórek badanych linii komórkowych Doktorant zastosował metodę cytometrii przepływową i FITC jako barwnik fluorescencyjny, znakujący utleniony grafen. Autor nie podaje jako liczba komórek (events) była zliczana jednorazowo przez urządzenie, ile było wykonywanych zliczeń z jednej próbki i ile było wykonanych powtórzeń eksperymentu dla poszczególnych linii A549, LL-24 i HUVEC. W tabeli 3, tabeli 4 i tabeli 5 przedstawiony jest średni sygnał próby do kontroli, nie jest wyjaśnione pojęcie sygnału (co przedstawia, jaką wartość), na rysunkach 28, 29 i 30 występuje jako skrót angielski MFI – średnia intensywność fluorescencji. To powinno być wyjaśnione w opisie rysunku.

W podrozdziale 3.3.4 Wnioski i dyskusja, Doktorant podkreśla, że przeprowadzone badania są „jedną z pierwszych prób oceny jednoczesnego wpływu inkubacji w surowicy i rozmiarów płatek GO na ich efektywność wnikania do komórek ssaczych różniących się morfologią, pochodzeniem oraz typem.” Tu pojęcie komórek ssaczych jest podobnie jak w tytule i innych miejscach tekstu monografii bezzasadnie rozszerzone, bo dotyczy wyłącznie badań na komórkach ludzkich.

Badania nad oceną mechanizmu wnikania GO do komórek badanych linii komórkowych w użyciu inhibitorów szlaków, odpowiedzialnych za pobieranie cząstek z otoczenia okazały się nieznamiennie statystycznie, przyjmując brak oznaczenia znamienności na wykresach w rycinach od 34 do 38. W opisie tych eksperymentów brakuje informacji, co stanowiło kontrolę względem której oznaczano efektywność wnikania utlenionego grafenu do komórek.

Spektakularne są wyniki badań obrazowych prowadzonych z użyciem mikroskopu konfokalnego przedstawiające lokalizację frakcji GO w strukturze badanych komórek linii A549, LL-24 i HUVEC.

Nowatorski charakter badawczy mają eksperymenty prowadzone w monokulturze i kokulturach nad wnikaniem i lokalizacją utlenionego grafenu w mikrosystemie Cell-on-a –Chip w trybach ciągłym i przerywanym. Należy zaznaczyć, że w warunkach standardowej hodowli w skali makro prowadzi się również hodowle w kokulturze komórkowej i przeciwieństwie do hodowli przepływowej, której przewagę nad hodowlą standardową Doktorant wielokrotnie podkreśla w monografii. Ponadto w hodowli standardowej możliwe jest badanie produktów metabolizmu, syntetyzowanych przez komórki cząsteczek lub produktów egzocytozy w medium komórkowym, co mogłoby być wykorzystane do zweryfikowania tezy, czy płatki GO nie są wydalone z komórek na drodze egzocytozy (Wnioski 3.5.5).

Katedra Patofizjologii

ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: [patofizjo@cm-uj.krakow.pl](mailto:patofizjo@cm-uj.krakow.pl)

[www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl](http://www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl)



UNIwersytet Jagielloński  
COLLEGIUM MEDICUM  
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Poza wymienionymi niedociągnięciami/brakami badawczymi, chciałabym również wspomnieć o drobnych uchybieniach edytorskich, typu błąd literowy, powtórzenie wyrazu, interpunkcja czy kolokwializmy jak „zlano”, „odciągnięto” czy „zwymiarowano”, które nie pomniejszają wartości merytorycznej monografii.

Praca doktorska Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego stanowi oryginalne i nowatorskie opracowanie naukowe tematu badawczego, w którym Doktorant przeprowadził badania eksperymentalne w modelowych układach hodowli komórkowych linii prawidłowych LL-24, HUVEC i nowotworowej A549 oraz ich kokulturach, w skali makro i mikro, w specjalnie opracowanym do badań mikrosystemie. Wyniki tych badań odpowiedziały na postawione cele badawcze, wykazują potencjalne implikacje biomedyczne i kliniczne, w szczególności onkologiczne, a kontynuowanie tematyki badawczej może przyczynić się do opracowania efektywnego nośnika terapeutyków.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego odpowiada merytorycznym i formalnym wymogom stawianym do uzyskania stopnia doktora, określonym w art. 187 ust.1-4 Ustawy z dnia 20. lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668).

W związku z tym, wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia w Politechnice Warszawskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Bartłomieja Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra Patofizjologii UJ CM

*prof. dr hab. Jolanta Kaszuba-Zwoińska*

Prof. dr hab. n. med. Jolanta Kaszuba-Zwoińska

Katedra Patofizjologii

ul. Czysta 18, 31-121 Kraków, tel. +48 12 633 39 47, e-mail: patofizjo@cm-uj.krakow.pl

www.patofizjologia.cm-uj.krakow.pl