

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik
pod tytułem**

„Wpływ nanocząstek metalicznych i nanomateriałów węglowych w badaniach na modelu wybranych linii raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowych liniach komórkowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Mateusza Wierzbickiego w Katedrze Nanobiotechnologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy oceny potencjału przeciwnowotworowego nanocząstek metalicznych oraz nanomateriałów węglowych. Tematyka pracy doktorskiej jest tym samym silnie interdyscyplinarna, gdyż łączy obszar badawczy biologii, medycyny eksperymentalnej oraz nanotechnologii. Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się także w aktualny nurt badawczy koncentrujący się na poszukiwaniu, charakterystyce oraz wykorzystaniu inżynierii materiałowej do opracowywania oraz projektowania skutecznych terapii przeciwnowotworowych. W szczególności badania opisane w pracy doktorskiej mogą mieć duży potencjał dla opracowywania nowych narzędzi, procedur oraz rozwiązań technologicznych mających zastosowanie dla medycyny spersonalizowanej oraz precyzyjnej.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Wójcik stanowi zbiór trzech artykułów opublikowanych w latach 2021-2023 w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w aktualnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MNiSW. Są to następujące prace:

- 1) Wójcik B, Sawosz E, Szczepaniak J, Strojny B, Sosnowska M, Daniluk K, Zielińska-Górska M, Bałaban J, Chwalibog A, Wierzbicki M. Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3. Int J Mol Sci. 2021 Nov 9;22(22):12100. doi: 10.3390/ijms222212100.**

- 2) **Wójcik B**, Zawadzka K, Sawosz E, Sosnowska M, Ostrowska A, Wierzbicki M. Cell Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms. *Nanotechnol Sci Appl*. 2023 Dec 14;16:41-57. doi: 10.2147/NSA.S439185.
- 3) **Wójcik B**, Zawadzka K, Jaworski S, Kutwin M, Sosnowska M, Ostrowska A, Grodzik M, Małolepszy A, Mazurkiewicz-Pawlicka M, Wierzbicki M. Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines. *Nanotoxicology*. 2023 Jun;17(4):310-337. doi: 10.1080/17435390.2023.2218925.

Prezentacja zbioru artykułów została poprzedzona oświadczeniem Doktorantki o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej z poszanowaniem zasad etyki, spisem treści, streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, wykazem skrótów, wprowadzeniem teoretycznym, opisem hipotezy badawczej, podaniem celu głównego oraz celów szczegółowych, przedstawieniem zakresu prac, opisem materiału i metod badawczych, omówieniem głównych wyników w zakresie każdej z prac wchodzących w cykl składający się na rozprawę doktorską, podsumowaniem, wnioskami, bibliografią.

Do ocenianej dysertacji dołączono pełne teksty publikacji, które stanowią podstawę do ubiegania się o nadanie stopnia doktora oraz wyniki dodatkowe będące uzupełnieniem do tychże publikacji.

Dodatkowo zgodnie z przyjętymi wymogami formalnymi do pracy doktorskiej dołączono oświadczenia Doktorantki i współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej opisujące rolę Doktorantki oraz pozostałych współautorów w powstawaniu w/w publikacji.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace prezentujące wyłącznie oryginalne wyniki eksperymentalne, w których Doktorantka zajmuje miejsce pierwszego autora. Każdy z artykułów ukazał się w czasopiśmie należącym do różnych wydawnictw.

Udział Doktorantki w powstaniu w/w artykułów polegał m.in., na wykonywaniu analiz, opracowaniu wyników, wizualizacji uzyskanych danych, przygotowaniu i redakcji manuskryptu. Wiodący udział Pani mgr inż. Wójcik w prowadzeniu badań będących podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora jest bezsprzeczny.

Udział pozostałych autorów polegał głównie na analizach z wykorzystaniem technik spektroskopowych, weryfikacji i walidacji wyników otrzymanych przez Doktorantkę, wykonaniu obrazowania z użyciem TEM, opracowaniu koncepcji badań, metodologii oraz redakcji manuskryptu.

Ocena spójności tematycznej zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych

Pracę doktorską, jak już zaznaczono powyżej, stanowi cykl trzech opublikowanych artykułów naukowych. Pierwsza z cyklu praca opublikowana w *Int. J. Mol. Sci.* opisuje ocenę potencjału srebra, złota, platyny, tlenku grafenu, diamentu i fullerenolu jako środków przeciwnowotworowych przeciwko komórkom gruczolakoraka trzustki. W drugiej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Nanotechnol. Sci. Appl.* Doktorantka dokonała oceny wpływu grafenu, tlenku grafenu, fullereny i nanofilmów diamentowych na linie komórkowe raka piersi i glejaka IV stopnia. Z kolei w artykule opublikowanym w *Nanotoxicology* Pani mgr inż. Wójcik przeanalizowała wpływ trzynastu rodzajów nanocząstek diamentowych, różniących się metodą produkcji, rozmiarem i powierzchniowymi grupami funkcyjnymi, na ich cytotoksyczność wobec czterech linii komórek nowotworowych (T98G, U-118 MG, MCF-7 i Hep G2) oraz jednej linii komórek nienowotworowych (HFF-1).

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, że wszystkie załączone prace stanowią spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, tym samym warunek ustawowy jaki powinna spełniać praca doktorska, w tym zakresie należy uznać za spełniony.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Wprowadzenie teoretyczne do tematyki pracy doktorskiej zostało opracowane kompleksowo i zawiera syntetyczne podsumowanie wyzwań związanych z chorobami nowotworowymi. W tej części pracy zawarto także krótką charakterystykę właściwości biologicznych nanomateriałów metalicznych oraz węglowych. Wprowadzenie jest krótkie, ale merytorycznie uzasadnione w aspekcie specyfiki dysertacji oraz dołączonych do niej pełnych tekstów publikacji.

Za szczególnie cenne uważam wydzielenie hipotezy badawczej oraz sformułowanie adekwatnych do niej celów badawczych. Ważnym elementem pozwalającym czytelnikowi łatwo przeanalizować treści publikacji jest także wydzielona sekcja opisująca zakres prac badawczych.

Podsumowując powyższe stwierdzam, że opisany w dysertacji Pani mgr inż. Wójcik cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ realizacja tego celu istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowej wiedzy oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozdział zatytułowany „Metodyka badań” opisuje nanomateriały użyte w badaniach oraz modele badawcze *in vitro*. Opis został uporządkowany zgodnie z kolejnością załączonych publikacji.

W badaniach wykorzystano hydrokoloidalne zawiesiny nanocząstek metalicznych oraz węglowe, tj. grafen, tlenku grafenu, nanocząstki diamentu i fullerenolu. Dodatkowo w badaniach wykorzystano również diamenty funkcjonalizowane na powierzchni grupami karboksylowymi, aminowymi, lub hydroksylowymi. Analizowane nanomateriały otrzymywane były różnymi metodami produkcji.

W badaniach wykorzystano zestaw różnych linii komórkowych, w tym modele komórkowe raka trzustki, piersi, wątroby, glejaka oraz nienowotworowe linie komórkowe. Pewien niedosyt pozostawia brak dobrego uzasadnienia dla doboru użytych linii komórkowych. Wskazane byłoby, aby podczas publicznej obrony pracy doktorskiej Pani mgr. inż. Wójcik uzasadniła wybór modeli komórkowych lub podała klucz dla ich doboru do zaprojektowanych doświadczeń.

Za cenne uważam wykorzystanie do realizacji badań toksykologicznych technologii biodruku 3D.

Należy podkreślić, że wszystkie nanomateriały jako materiał badawczy zostały bardzo dokładnie scharakteryzowane z użyciem adekwatnych metod każdorazowo przed przystąpieniem do prac z ich wykorzystaniem w układach komórkowych.

W dysertacji zamieszczono także bardzo użyteczne dla czytelnika schematy przedstawiające etapy doświadczeń opisanych w każdej z publikacji, co niezwykle porządkuje i systematyzuje przedstawione treści. Po przeczytaniu nie mam krytycznych uwag do tej części. Rozdział poprzedzający zbiór artykułów został opracowany poprawnie w aspekcie uzasadnienia podjęcia badań przez Doktorantkę. Całość wprowadzenia zawiera także wszystkie niezbędne informacje potrzebne dla zrozumienia omawianych w dalszej części doktoratu treści.

Po zapoznaniu się z treścią publikacji chciałem podkreślić, że wysoko oceniam wartość merytoryczną wszystkich artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

W szczególności za cenne wyniki uważam przedstawione w publikacji zatytułowanej „*Dependence of diamond nanoparticle cytotoxicity on physicochemical parameters: comparative studies of glioblastoma, breast cancer, and hepatocellular carcinoma cell lines*” opublikowane w wiodącym czasopiśmie w dyscyplinie, tj. *Nanotoxicology*.

Przedstawione wyniki w/w publikacji są ważne dla świata nauki, ponieważ istotnie poszerzają wiedzę w zakresie identyfikacji krytycznych fizykochemicznych parametrów nanocząstek diamentowych oraz podkreślają znaczenie metod ich otrzymywania w aspekcie ich późniejszego zastosowania w aplikacjach biomedycznych. W badaniach użyto aż 13 typów nanocząstek diamentów, a badania przeprowadzono z użyciem 4 linii nowotworowych oraz jednej linii komórkowej nienowotworowej. Sam ten fakt wskazuje na skalę badań oraz ich znaczenie ze względu na dużą liczbę wygenerowanych danych podczas eksperymentów. Tak duży zestaw wyników ma sam w sobie ogromny potencjał dla każdego badacza zajmującego się tematyką biokompatybilności nanodiamentów oraz biologią komórek nowotworowych.

Przeprowadzone analizy wykazały, że nanocząstki diamentowe nie wykazywały znaczącej toksyczności względem komórek MCF-7, Hep G2 i HFF-1. Co ciekawe linie komórkowe glejaka T98G i U-118 MG były bardziej wrażliwe na ich obecność. Doktorantka wykazała także, że metoda produkcji nanodiamentów nie miała znaczącego znaczenia na ich cytotoksyczność względem badanych komórek. W publikacji opisano także ważny wynik wskazujący, że obecność grup karboksylowych może silniej stymulować cytotoksyczność w porównaniu do ich modyfikacji powierzchni nanodiamentów.

Z kolei w publikacji zatytułowanej „*Line-Dependent Adhesion and Inhibition of Proliferation on Carbon-Based Nanofilms*” za szczególnie cenne wyniki oceniam te wskazujące, iż nanofilmy grafenu i nanocząstki diamentu charakteryzuje wybiórcza specyficzność względem komórek nowotworowych. Za ważny aspekt tej publikacji uważam również przeprowadzenie badań z zastosowaniem biodrukowanych modeli 3D. Dzięki temu modelowi udało się ocenić wpływ czynników mechanicznych oraz chemicznych, których źródłem były nanofilmy utworzone z nanomateriałów węglowych na parametry związane z proliferacją i adhezją komórek oraz porównanie ich z typową hodowlą w formie monowarstwy.

W trzeciej pracy zatytułowanej „*Effects of Metallic and Carbon-Based Nanomaterials on Human Pancreatic Cancer Cell Lines AsPC-1 and BxPC-3*” za szczególnie cenne wyniki uważam te wskazujące, iż tlenek grafenu oraz nanodiamenty mogą indukować zmiany

w odpowiedzi prozapalnej komórek nowotworowych. Jest to cenny wynik, ponieważ Doktorantka zwróciła uwagę na istotny wskaźnik oceny biokompatybilności nanomateriałów, jakim jest poziom cytokin prozapalnych. Wynik ten ma bardzo duże znaczenie dla określenia nowego potencjalnego zastosowania analizowanych nanomateriałów jako induktorów lub inhibitorów czynników prozapalnych.

Podsumowując oceniane wyniki chciałbym stwierdzić, że jakość wyników oraz ich znaczenie dla rozwoju dyscypliny nauk biologicznych nie budzą zastrzeżeń i zasługują na uznanie.

Po przeczytaniu i analizie wyników ma kilka pytań natury ogólnej związanych z wynikami zaprezentowanymi w ocenianej dysertacji.

- 1) Czy Doktorantka dostrzega jakieś wady użytego systemu biodrukowanych modeli *in vitro* 3D w badaniu nanomateriałów?
- 2) Czy toksyczność oraz pobieranie badanych materiałów zastosowanych w tym samym stężeniu np. 100 µg/ml może zależeć od wielkości powierzchni naczynia hodowlanego oraz liczby komórek? Od czego zależy efektywność pobierania nanomateriałów przez komórki w układach *in vitro*?
- 3) Czy we wszystkich typach oznaczeń stosowano tę samą liczbę komórek? W załączonych publikacjach nie zawsze jest podana informacja o liczbie komórek przy każdym z użytych testów.
- 4) Czy warunki głodzenia komórek mogą mieć znaczenie dla badania toksyczności nanomateriałów? Jeżeli tak, to które z zaprezentowanych wyników mogły być najbardziej wrażliwe na ten proces.
- 5) Czy stosowanie badanych nanomateriałów może promować zmienność komórkową w obrębie populacji komórek nowotworowych?
- 6) Co wiadomo o genotoksyczności badanych nanomateriałów?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik spełnia warunki określone w Ustawie Prawo o szkolnictwo wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2023 r. poz. 742). Doktorantka dowiodła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. Stwierdzam także, że oceniana



przeze mnie praca doktorska wnosi nowe informacje do dyscypliny nauki biologiczne. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Barbary Urszuli Wójcik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową otrzymanych przez Doktorantkę wyników dotyczących charakterystyki biokompatybilności metalicznych i węglowych nanomateriałów oraz znaczenie opublikowanych wyników dla badań nanotoksykologicznych wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Rzeszów, 1/06/2024

Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR