

Lublin, 04.11.2019.

**Opinia o rozprawie doktorskiej mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej  
zatytułowanej:**

*„Badania nad zastosowaniem pochodnych grafenu w terapii przeciwnowotworowej  
z wykorzystaniem przepływowch systemów typu Lab-on-a-Chip”*

Promotor: prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka  
Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska

Rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej została wykonana w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Jej tematyka integralnie wpisuje się w badania prowadzone w Zespole Biomedycznych Systemów *Lab-on-a-Chip* (LOC) kierowanym przez promotora prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózkę, które dotyczą opracowania i wytwarzania mikrosystemów znajdujących zastosowanie w inżynierii komórkowej, biotechnologii i medycynie.

**Wybór tematyki**

Choroby nowotworowe występują powszechnie i po chorobach układu krążenia są drugą przyczyną zgonów. Pomimo profilaktyki, skutecznych metod diagnostycznych oraz leczenia wzrasta zachorowalność i umieralność na nowotwory. Zgodnie z prognozami raportu GLOBOCAN 2018 liczba zachorowań na nowotwory w ciągu pięciu lat wzrosnie o 5,2 mln (z 14,1 do 19,3 mln). Współczesna onkologia wykorzystuje szereg metod leczenia nowotworów, niemniej jednak poszukuje się nowych, bardziej skutecznych terapii. Świadczy o tym chociażby przyznanie w 2018 roku Nagrody Nobla z obszaru medycyny i fizjologii Jamesowi P. Allisonowi i Tasuku Honjo za wkład w rozwój immunoterapii nowotworów. Wyzwanie stanowi również poprawa skuteczności obecnie stosowanych terapii, do których należy m. in. terapia fotodynamiczna (PDT) wykorzystywana obecnie w leczeniu wielu zmian nowotworowych w różnym stopniu zaawansowania. Jej istotą jest selektywne niszczenie wybranych komórek za pomocą światła w obecności fotouczulacza.

Tematyka ocenianej rozprawy doktorskiej pt. *„Badania nad zastosowaniem pochodnych grafenu w terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem przepływowch systemów typu Lab-on-a-Chip”* jest więc niezwykle aktualna oraz ważna i wiąże się nanotechnologią i wywodzącą się z niej nanomedycyną jako skuteczne w przyszłości narzędzie w walce z chorobami nowotworowymi. Są to nowatorskie rozwiązania dotyczące wykorzystania nowej generacji nanomateriałów w celu zwiększenia selektywności i efektywności metody fotodynamicznej, nieinwazyjnej metody leczenia chorób nowotworowych, cechującej się znacznie mniejszymi skutkami ubocznymi w porównaniu do standardowych terapii tj. chirurgia czy radio- i chemioterapia, prowadzących do licznych powikłań związanych z uszkodzeniem zdrowych tkanek. Jednym z takich obiecujących nanomateriałów o unikatowych właściwościach fizykochemicznych jest grafen i jego pochodne, zwłaszcza tlenek grafenu (GO), który ze względu na możliwość modyfikacji jego rozwiniętej powierzchni właściwej potencjalnie mógłby być wykorzystywany jako nośnik leków, w tym fotouczulaczy lokalizujących się przede wszystkim w tkance nowotworowej.

Głównym celem badań prezentowanych w ocenionej rozprawie doktorskiej było określenie skuteczności terapii fotodynamicznej, z wykorzystaniem nowych materiałów grafenowych jako nośników wybranych fotouczulaczy, w biomimetycznych układach modelowych komórek i warunkach najbardziej zbliżonych do warunków *in vivo*, tj. przestrzennych struktur komórek prawidłowych i nowotworowych otrzymanywanych w przepływowch mikroukładach typu *Cell-on-a-Chip* (COC).



## Formalna ocena pracy doktorskiej

Pani mgr inż. Agnieszka Żuchowska przedstawiła napisaną w języku polskim rozprawę doktorską liczącą 163 strony. Jej treść zawarta jest w dwóch głównych rozdziałach: części literaturowej (rozdział I – 38 stron) na bazie przeglądu doniesień naukowych i części badawczej (rozdział II – 97 stron), zawierającej (i) cel i zakres badań, (ii) stosowane materiały, aparaturę i metodologię przeprowadzonych badań oraz (iii) opis i dyskusję wyników z równoczesnym ich dyskusyjnym komentarzem zakończonym krótkim podsumowaniem każdego podrozdziału. Taki sposób prezentacji wyników jest bardzo przejrzysty i godny polecenia. W kolejnych dwóch rozdziałach znajduje się podsumowanie najważniejszych wyników i sformułowane wnioski (rozdział III – 3 strony) oraz spis cytowanej literatury (rozdział IV – 17 stron). Pracę doktorską uzupełniono o większość elementów wymaganych w tego typu opracowaniach, tj. spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji własnych z podziałem na pozycje przedstawiające wyniki omówione w pracy doktorskiej oraz publikacje niezwiązane z tematyką doktoratu, listę zgłoszeń patentowych, wzmiankę o wystąpieniach na konferencjach krajowych i międzynarodowych oraz nagrody uzyskane za działalność naukową.

## Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

O teoretycznym przygotowaniu mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej do systematycznych i wielowątkowych badań doświadczalnych oraz merytorycznej dyskusji uzyskanych wyników świadczy część literaturowa pracy doktorskiej, która stanowi 39% głównej części dysertacji, co potwierdza, że zostały zachowane właściwie proporcje przy jej opracowaniu. Po wprowadzeniu i uzasadnieniu podjętej tematyki badawczej kolejne podrozdziały przeglądu literaturowego zredagowane są w bardzo przystępnej formie i dotyczą zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy. Doktorantka omówiła znaczenie i zalety terapii fotodynamicznej w leczeniu zmian nowotworowych oraz podstawy fizykochemiczne metody ze szczególnym uwzględnieniem dwóch głównych mechanizmów reakcji fotodynamicznej. Istotną rolę w PDT odgrywają fotoczułacz, dlatego dalej została przedstawiona charakterystyka związków fotoaktywnych pod kątem ich wykorzystania w diagnostyce i terapii fotodynamicznej oraz systemy ich dostarczania do tkanek nowotworowych. Na uwagę zasługuje kolejny podrozdział poświęcony materiałom grafenowym, a w szczególności tlenkowi grafenu i jego zredukowanej formie, najczęściej wykorzystywanych w badaniach biologicznych. Pogłębianie wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych materiałów grafenowych ma istotne znaczenie przy ich modyfikacji oraz wykorzystaniu pochodnych grafenu jako potencjalnych nośników leków przeciwnowotworowych i fotoczułaczy. Autorka dysertacji doktorskiej zdaje sobie sprawę z konieczności określenia biokompatybilności i toksyczności wspomnianych nanomateriałów przed ich klinicznym zastosowaniem, dlatego dalej następuje omówienie takich badań w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Na zakończenie Doktorantka skupiła się na bardziej zaawansowanych eksperymentach na poziomie komórkowym związanych z wykorzystaniem mikroukładów *Cell-on-a-Chip* jako narzędzi do dwuwymiarowej oraz przestrzennej hodowli komórek nowotworowych oraz badania skuteczności wybranych metod leczenia nowotworów.

Część literaturową kończy podsumowanie. Przy opracowaniu przeglądu literaturowego Doktorantka skorzystała ze 157 odnośników, od 1859 do 2019 roku, przy czym publikacje, które ukazały się po 2000 roku stanowią ponad 92%, a z ostatniej dekady ok. 57%. Pani mgr inż. Agnieszka Żuchowska przestudiowała bogatą literaturę zwracając uwagę na publikacje z okresu dynamicznego wzrostu zainteresowania materiałami grafenowymi i zminiaturyzowanymi mikrosystemami typu LOC. Spis cytowanych źródeł przygotowany jest starannie z pełnymi danymi bibliograficznymi, co wymagało zwiększonego nakładu pracy, ale bardzo ułatwia śledzenie zgodności cytowanego odnośnika z omawianymi zagadnieniami.

Moim zdaniem informacje zawarte w części literaturowej są bardzo ciekawe, dobrze opracowane i umiejętnie przybliżają problematykę rozprawy doktorskiej, stanowiąc jednocześnie dobre wprowadzenie do badań eksperymentalnych, uzyskanych wyników i ich dyskusji.

Część badawcza zawiera bardzo obszerny, dobrze zaplanowany i systematycznie realizowany materiał doświadczalny. Wyniki badań opisane w tekście i zobrazowane na 38 rysunkach i schematach oraz w 5 tabelach są przedstawione w sposób czytelny, a przeprowadzone liczne procedury eksperymentalne są dobrze omówione i wyjaśnione. Do udokumentowania poprawności uzyskanych wyników i ich merytorycznej dyskusji Doktorantka skorzystała tematyczną literaturą przez co spis cytowanej bibliografii powiększył się o dodatkowe 44 pozycje i w końcowym efekcie obejmuje 201 odnośników. Pani mgr inż. Agnieszka Żuchowska omówienie wyników swoich badań zaprezentowała w czterech rozdziałach, które zawierały wiele aspektów naukowych.

Na wstępie Doktorantka skoncentrowała się na badaniach cytotoxyczości tlenku grafenu i jego dwóch zmodyfikowanych form: GO-glukozaamina (G25) i GO-etylenodiamina (G26) w stosunku do prawidłowych (MRC-5 i HMF) i nowotworowych (A549 i MCF-7) komórek płuc i piersi. Ten nurt badań obejmował m. in. charakterystykę fizykochemiczną tlenku grafenu za pomocą technik mikroskopowych (HR-TEM, SEM), spektroskopowych (FTIR-ATR), fluorescencji rentgenowskiej (XFR), ocenę jego czystości mikrobiologicznej (posiew mikrobiologiczny) oraz wpływ tlenku grafenu, przed i po jego modyfikacji, na żywotność/proliferaację badanych linii komórkowych (test alamarBlue®, barwienie różnicowe). Badania eksperymentalne dotyczyły m. im. określenia stabilności dyspersji materiałów grafenowych w roztworach biologicznych, wpływu ich stężenia i czasu na aktywność metaboliczną badanych komórek, umiejscowienia GO, G25 i G26 w hodowlach komórkowych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że poniżej stężenia 300 µg/mL tlenek grafenu jest biokompatybilny i wykazuje powinowactwo do komórek nowotworowych, a na jego cytotoxyczość może wpływać obecność zanieczyszczeń chemicznych i mikrobiologicznych. Ponadto, udało się uzyskać stabilne dyspersje materiałów grafenowych w roztworze medium hodowlanego z dodatkiem poliwinylpirolidonu, odpowiadającym płynom biologicznym. Bardzo ważnym wnioskiem wynikającym z tego etapu badań było wykazanie, że zarówno GO jak i jego pochodne G25 i G26 ze względu na brak cytotoxyczości i powinowactwo do komórek nowotworowych mogłyby być w przyszłości stosowane jako selektywne nośniki leków przeciwnowotworowych.

Drugi nurt badań związany był z wykorzystaniem nowo zaprojektowanych mikrosystemów przepływowych typu *Cell-on-a-Chip* do otrzymania sferoidów zbudowanych z prawidłowych i nowotworowych komórek płuc i piersi, które bardziej odzwierciedlają warunki *in vivo*. W celu optymalizacji ich formowania Doktorantka przeprowadziła wiele precyzyjnych badań starając się skorelować szereg parametrów (geometria układu, szybkość przepływu, rodzaj komórek) na efektywność procesu, agregację i żywotność trójwymiarowych struktur i czasu hodowli. Do wizualizacji i monitorowania hodowli sferoidów badanych komórek Doktorantka wykorzystwała odwrócony mikroskop fluorescencyjny wyposażony w kamerę CCD, natomiast do weryfikacji warunków przepływu medium hodowlanego symulację modelowania komputerowego za pomocą oprogramowania COMSOL Multiphysics z modułem MEMS. Kompleksowa analiza wielu paramentów (mikroukład i/II) pozwoliła na opracowanie procedury długoterminowej hodowli stabilnych sferoidów zbudowanych z prawidłowych i nowotworowych komórek płuc i piersi w nowo opracowanym mikroukładzie III. Bardzo ważnym elementem tych badań było wykorzystanie kolejnego nowatorskiego przepływowego mikroukładu IV zaprojektowanego do hodowli układów komórkowych o wymiarach 2D i 3D w kontekście oceny skuteczności terapii fotodynamicznej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że oba mikroukłady *Cell-on-a-Chip* (III i IV) zostały zgłoszone do opatentowania.

Przechodząc do dalszych etapów Doktorantka skupiła się na badaniach oceny skuteczności PDT na modelowych układach 3D komórek płuc i piersi uzyskanych w przepływowym mikrosystemie IV. Jako fotouczulacze wykorzystwała kwas 5-aminolewulinowy (ALA) (komórki płuc) i mezo-tetrafenyloporfiryne (TPP) oraz jej enkapsulowaną postać (nano-TPP) (komórki piersi). Na podstawie badań żywotności sferoidów A549 i MRC-5 i akumulacji PpIX indukowanej ALA w ich strukturach Autorka wykazała, że fotouczulacz wykazuje większe powinowactwo do komórek nowotworowych zmniejszając ich żywotność po aktywacji światłem. Potwierdzeniem tego faktu było wygenerowanie reaktywnych form tlenu (ROS) tylko w sferoidach komórek nowotworowych A549. Podobnie zależności uzyskano dla obu form TPP, przy czym nano-TPP w większym stopniu akumulowała się na sferoidach MCF-7. Tak więc skuteczność terapii fotodynamicznej z mezo-tetrafenyloporfiryne można zwiększyć stosując fotouczulacz w postaci enkapsulowanej. Co ciekawe, okazało się, że skuteczność PDT może być zauważalna dopiero po pewnym czasie i zależy od stężenia fotouczulacza.

Ostatni wątek pracy dotyczył wykorzystania pochodnych grafenu jako selektywnych nośników mezo-tetrafenyloporfiryny w terapii fotodynamicznej. Na podstawie wcześniej uzyskanych wyników Doktorantka do badań wybrała kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych piersi MCF-7/HMF wytworzone w przepływowym mikrosystemie IV do podwójnej hodowli komórek w postaci monowarstwy i sferoidów. Badania wstępne obejmowały wpływ GO i jego pochodnych (G25 i G26) o różnym stężeniu na żywotność/proliferaację modelowych układów tkanki nowotworowej piersi (2D i 3D) po upływie 24 i 48 godz., a następnie koniugatów GO i G26 z zaadsorbowaną mezo-tetrafenyloporfiryne. Kolejnym etapem była ocena skuteczności terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem koniugatów GO-TPP i G26-TPP na podstawie wnikliwej analizy cytotoxyczości, fototoksyczności, ich lokalizacji w hodowli 2D i 3D oraz zdolności do generowania reaktywnych form tlenu. Doktorantka stwierdziła, bardziej wiarygodne badania skuteczności terapii PDT uzyskuje się stosując trójwymiarowy model kokultury MCF-7/HMF, gdyż lepiej odzwierciedla tkankę nowotworową

w warunkach *in vivo*. Porównując skuteczność terapii fotodynamicznej w sferoidach hodowli kokultury MCF-7/HMF z zastosowaniem różnych form mezo-tetrafenyloporfiryny (wolna TPP, nano-TPP, GO-TPP i G26-TPP) wykazała że, lepszy efekt terapeutyczny uzyskuje się stosując jako fotouczulacze koniugaty grafenowe, a w szczególności G26-TPP, w wyniku zwiększenia skuteczności selektywnego dostarczenia TPP do komórek nowotworowych.

W recenzji trudno odnieść się do wszystkich wyników, obszernej ich dyskusji i wyprowadzonych przez Autorkę wniosków. Uważam, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele pracy, udowadniając, że badane pochodne grafenu mogą być z powodzeniem stosowane jako nośniki związków fotoaktywnych w terapii przeciwnowotworowej. Bardzo ważnym aspektem badań skuteczności i selektywności nowych związków w terapii fotodynamicznej było wykorzystanie biomimetycznych, przestrzennych układów kokultury komórek nowotworowych i prawidłowych odzwierciedlających cechy tkanki nowotworowej w warunkach przepływowch z wykorzystaniem mikrosystemów *Cell-on-a-Chip*.

Przedstawione szeroko zakrojone prace badawcze Doktorantki są wartościowe nie tylko ze względu na systematykę, ale również kompleksowy charakter badań, pozwalający na wyciągnięcie praktycznych uogólnień. Dobór odpowiednich materiałów, metod i procedur badawczych z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury świadczą o wysokim poziomie umiejętności mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej, zarówno merytorycznych jak i eksperymentalnych. O Jej niekwestionowanej dojrzałości naukowej i kompetencjach świadczy sposób wnikliwej prezentacji uzyskanych wyników rozpoczynający się od ich opisu, poprzez merytoryczną dyskusję w odniesieniu do rezultatów innych autorów zakończoną podsumowaniem i zwróceniem uwagi na najważniejsze osiągnięcia.

### Ocena edycji pracy

Przy ocenie edycji pracy doktorskiej stwierdzam, że jest ona zredagowana poprawnie pod względem językowych i stylistycznym. Przy opracowaniu tak bogatego materiału Autorka nie ustrzegła się pewnych usterek redakcyjnych (np. tzw. literówek), powtórzeń oraz nieścisłości, na które chciałabym zwrócić uwagę z obowiązku recenzenta.

- Pewną niedogodnością przy czytaniu pracy jest brak spisu akronimów, tym bardziej, że w tekście pracy przy jednych skrótowcach są wyjaśnienia od jakich słów pochodzą, natomiast przy innych takiej informacji nie ma.
- W pracy często powtarzane są akronimy z wyjaśnieniami (np. tlenek grafenu (GO), terapia fotodynamiczna (PDT)). Po wyjaśnieniu akronimu przy pierwszym użyciu w tekście dalej można odnosić się już tylko do akronimu.
- We wprowadzeniu zamiennie używane są słowa nowotwór i rak. Dla uściślenia warto byłoby podkreślić, że każdy rak jest nowotworem złośliwym, chociaż nie każdy nowotwór złośliwy jest rakiem.
- Na str. 26 Doktorantka podaje, że odległości między sąsiednimi atomami węgla w warstwie grafenu wynoszą 0,0142 nm, podczas gdy długość wiązania węgiel-węgiel wynosi 0,142 nm czyli 1,42 Å.
- Na str. 43 znajduje się odnośnik do rysunku I.7B, którego nie ma w pracy (chodzi o rysunek I.8B), natomiast odnośniki do rysunków 20A (str. 96) i 23 A (str. 103) dotyczą rysunków II.20 A i II.23 A.
- Na str. 83 można znaleźć sformułowanie „poli(żywołność/proliferaacja) (PDMS)”, na str. 89 „(Figura II.17 A)”, natomiast na str. 140 „(za skrótowo, rozwinąć opis)”.
- Autorka niejednokrotnie używa sformułowania „przeprowadzone badania pokazują”. Moim zdaniem w przypadku badań naukowych należałoby użyć raczej czasowników, tj. wykazać, stwierdzić, potwierdzić, udowodnić.
- W tekście w języku polskim odnośniki do rysunku i tabeli pisze się z małej litery.
- Na str. 95 Autorka pisze „Gotowy mikroukład III przedstawiono na Rysunku II.20 A”, natomiast w podpisie rysunku na str. 97 jest „Rysunek II. 20 (A) Wytworzony mikrosystem II”.
- Podobnie na str. 102 „Opracowany mikrosystem IV, przeznaczony do hodowli komórkowej w dwóch ułożeniach przestrzennych 2D i 3D został przedstawiony na Rysunku II.23”, a w podpisie rysunku na str. 104 jest „Rysunek II.23 (A) Schemat mikrosystemu III oraz metody modyfikacji mikrokomór hodowlanych”.
- Str. 134: Zawiesiny koniugatów wprowadzono raczej według schematu przedstawionego na rysunku II.23 C (str. 104), a nie na rysunku II. 30C (str. 120).
- Spis bibliografii jest przygotowany starannie, niemniej jednak w niektórych tytułach wyrazy pisane są z dużej litery (np. [25], [29], [36]....).

Przedstawione powyżej uwagi w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej bardzo obszernej i wielowątkowej rozprawy doktorskiej, która prezentuje wysoki poziom naukowy.

## Podsumowanie i wniosek końcowy

Bardzo dobrze udokumentowane wyniki prac badawczych Doktorantki stanowią atrakcyjną nowość naukową z zakresu nanotechnologii i mikrofluidyki w kontekście wykorzystania nowych nanomateriałów jako nośników wybranych fotouczulaczy i nowo zaprojektowanych przepływowych mikrosystemów typu *Cell-on-a-Chip* do dwuwymiarowej (monowarstwy 2D) oraz przestrzennej hodowli (sferoidy 3D) oraz analizy komórek nowotworowych w celu badania selektywności terapii fotodynamicznej. Tematyka pracy jest bardzo aktualna w obecnym czasie, kiedy wysiłek badaczy skupiony jest na udoskonalaniu mało inwazyjnych a jednocześnie skutecznych metod terapeutycznych diagnozowania i leczenia chorób nowotworowych. Nie mam uwag merytorycznych do interpretacji wyników badań uzyskanych przez Doktorantkę, które zostały poddane weryfikacji przez recenzentów podczas ich publikacji w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych. Doktorantka jest współautorką 16 publikacji, w tym 11 artykułów naukowych opublikowanych w ciągu 4 ostatnich lat bezpośrednio związanych z zakresem pracy doktorskiej. W 10 z nich mgr inż. Agnieszka Żuchowska jest pierwszą autorką, a w 4 jednocześnie autorem korespondującym. 7 prac, w których Doktorantka przedstawiła swoje wyniki notowanych jest w bazie JCR. Wśród nich można wymienić m. in. czasopisma, tj. *Sensor and Actuators B* (3 prace - IF 5,667 i 6,393), *Analitica Chimica Acta* (IF=5,123), *Biomicrofluidics* (IF=2,571). Ich sumaryczny *impact factor* jest wysoki i wynosi 29,222. Zgodnie z bazą Web of Science z dn. 25.10.2019 prace te były cytowane 36 razy, co świadczy, że znalazły uznanie w świecie naukowym. Na podkreślenie zasługują również zgłoszenia patentowe, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, dotyczące wykorzystywanych mikroukładów przepływowych typu *Cell-on-a-Chip* w badaniach na poziomie komórkowym oraz współfinansowanie części badań rozprawy doktorskiej ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów Sonata 5 i Opus 11.

Na podstawie oceny pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej, pt. pt. „*Badania nad zastosowaniem pochodnych grafenu w terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem przepływowych systemów typu Lab-on-a-Chip*” jednoznacznie stwierdzam, że spełnione są wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w myśl art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65/2003 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o jej przyjęcie i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze szeroki zakres precyzyjnych nowatorskich badań, ich wysoki poziom naukowy, oryginalny wkład oraz udokumentowaną aktywność naukową Doktorantki w rozwiązywanie postawionych problemów badawczych, o istotnym znaczeniu aplikacyjnym, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Żuchowskiej.

