

Warszawa, 18.06.2021

Dr hab. Sławomir Jakiela, prof. uczelni  
e-mail: slawomir\_jakiela@sggw.edu.pl  
tel.: +48 22 59 38626

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Natalii Flont pt. **”Badania nad opracowaniem przestrzennych modeli nowotworów jajnika i piersi z wykorzystaniem mikrosystemów Lab-on-a-chip oraz zastosowaniem ich do analizy skuteczności terapii przeciwnowotworowych,**” wykonanej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej

Promotor: Dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska, prof. uczelni

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z 4 części podzielonych na rozdziały i podrozdziały, spisu treści, streszczenia oraz dorobku naukowego Doktorantki - liczy 170 stron. Napisana została w języku polskim i ubogacona wykresami, kolorowymi schematami i rysunkami, a także tabelami. Styl pracy jest bardzo dobry, nieliczne są literówki, czy błędy gramatyczne. Edytorsko praca wygląda bardzo profesjonalnie.

Tematyka rozdziałów przedstawionych w pracy doktorskiej podzielona została na cztery części: i) przegląd literatury, ii) część doświadczalną, iii) podsumowanie i wnioski oraz iv) literaturę. Tematyka pracy doktorskiej ma charakter monotematyczny i dotyczy analizy skuteczności terapii nowotworowych w leczeniu nowotworów jajnika i piersi przy wykorzystaniu przestrzennych modeli komórkowych. Praca ma układ klasycznego doktoratu, tzn. Autorka na początku definiuje jasno cel pracy poprzez sformułowanie hipotezy badawczej, a następnie prezentuje przeprowadzone badania i dokonuje analizy wyników, by dokonać właściwej confirmacji swojej hipotezy. Przeprowadzone eksperymenty zostały opisane według schematu: materiały, metody badawcze, opis przeprowadzonych pomiarów, przedstawienie wyników, wyciągnięcie wniosków. Obok części doświadczalnej praca doktorska zawiera bardzo dobrze opisany przegląd literatury. Autorka odnosi się w nim do 168 pozycji, które prawie wszystkie zostały opublikowane w ostatnich 20 latach. Fakt ten nie dziwi, bowiem Doktorantka

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii  
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159  
02-776 Warszawa  
+48 22 59 38611  
kfb@sggw.edu.pl  
www.sggw.pl  
www.kf.sggw.pl

zajmuje się nowoczesnym, szybko rozwijającym się zagadnieniem badawczym. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że opisane badania stały się podstawą dwóch zgłoszonych patentów (jeden już został przyznany), sześciu recenzowanych publikacji oraz licznych wystąpień na konferencjach krajowych i zagranicznych.

### **Odnosnie części pierwszej – Przegląd literatury**

Pierwsza część stanowi wprowadzenie do tematyki badań jaką zajmuje się Doktorantka. Opisane w tej części zostały nowotwory z grupy chorób ginekologicznych oraz funkcjonowanie podścieliska łącznotkankowego w oddziaływaniu z komórkami nowotworowymi. Doktorantka opisała metody diagnostyki i leczenia nowotworów jajnika i piersi. Jeden z podrozdziałów został poświęcony wprowadzanej do klinicznego stosowania terapii fotodynamicznej, która jest wykorzystywana przez Autorkę w badaniach. Opisano tutaj również wykorzystanie systemów typu lab-on-a-chip, czyli małych laboratoriów biochemicznych umieszczanych najczęściej w przezroczystych polimerach wielkości karty kredytowej. Doktorantka referuje również hodowlę całych organów komórkowych na tego typu układach, które obecnie służą do modelowania chorób i testowania nowoczesnych leków.

Drobne błędy w tej części, które przytrafiły się Autorce:

- Na str. 19 Pani Magdalena Flont napisała: „Warunkiem zapoczątkowania reakcji fotodynamicznej jest korelacja pasma emisji źródła światła z fotouczulaczem.” Jest to stwierdzenie odrobinę mylące. Według recenzenta dobiera się źródło światła tak, by dopasować długość źródła światła do maksimum absorpcji fotouczulacza, tak by otrzymany efekt był jak najbardziej wydajny kwantowo. Nie trzeba korelować pasma emisji źródła światła z widmem absorpcyjnym fotouczulacza, które może być dość złożone.
- Na str. 20, przy opisie działania fotouczulacza, Doktorantka stwierdziła, że: „Po wzbudzeniu związku fotoaktywnego następuje krótkie, bezpromieniste przejście do stanu wzbudzonego  $S_1$  (tzw. relaksacja wibracyjna), a po nim przejście do podstawowego stanu singletowego  $S_0$ , któremu często towarzyszy emisja promieniowania fluorescencyjnego. Następnie, dochodzi do absorpcji światła, w wyniku czego PS przechodzi ze stanu  $S_0$  do wzbudzonego stanu singletowego  $S_1$ .....”

Niestety nie do końca tak jest, bo należy w tym miejscu zauważyć, że PS absorbuje kwant światła wzbudzającego, co indukuje przejścia elektronów ze stanu singletowego  $S_0$  do singletowych stanów wzbudzonych  $S_1$  oraz  $S_2$ . Stan singletowy  $S_2$  jest stanem bardzo krótko żyjącym - rząd femtosekund - dlatego elektrony ze stanu  $S_2$  szybko przechodzą do poziomów energetycznych stanu singletowego  $S_1$  w wyniku tzw. wewnętrznej konwersji, która zachodzi bezpromieniście. Elektrony, które znajdują się na poziomach energetycznych stanu singletowego  $S_1$ , mogą albo: i) przejść bezpromieniście na najniższy stan wibracyjno-rotacyjny stanu singletowego  $S_1$  (to nazywamy relaksacją wibracyjną) – skąd przechodząc do poziomów energetycznych stanu singletowego  $S_0$  emitują promieniowanie nazywane fluorescencją, albo ii) w wyniku przejścia międzystemowego przechodzą do bardziej stabilnych poziomów energetycznych stanu trypletowego  $T_1$ .

### **Odnosnie części drugiej – Część doświadczalna**

Część ta jest główną częścią pracy, w której zdefiniowano założenia i cel pracy oraz opisano wszystkie materiały i metody badawcze, które Doktorantka wykorzystwała w swoich badaniach. Wśród szczegółowo i klarownie opisanych metod badawczych można wymienić: rutynową hodowlę komórkową, procedury pasażu

i wysiewania komórek na płytki wielodołkowe, procedury wykonania 3 różnych układów mikroprzepływowych, metodę sterylizacji tychże układów, hodowlę komórkową 2D i 3D, metodę badania żywotności komórek hodowanych – test MTT, metodę oznaczania aktywności metabolicznej komórek – test AlmarBlue, metodę oznaczania wolnych rodników. Pani mgr inż. Magdalena Flont w swoich badaniach wykorzystywała m.in.: cytometr przepływowy do badania wpływu komórek prawidłowych na proliferację komórek nowotworowych, laserowy mikroskop konfokalny do lokalizacji fotouczulaczy i barwników w komórkach, mikroskop fluorescencyjny do obrazowania stanu komórek w układach mikroprzepływowych oraz spektrofлуorymetr pracujący z płytkami wielodołkowymi.

W części tej zostały również przedstawione wyniki przeprowadzonych badań wraz z analizą statystyczną, która głównie polegała na obliczaniu odchyłeń standardowych i na analizie jednostopniowej wariancji (test ANOVA).

Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentów, logicznie ze sobą powiązanych, by ostatecznie pokazać zalety badań przestrzennych wielowarstwowych układów komórkowych w systemach mikroprzepływowych. W rozdziale tym analizowany jest wpływ terapii fotodynamicznej przy wykorzystaniu meso-tetrafenyloporfiryny, zarówno w formie wolnej jak i enkapsulowanej, na ocenę jej skuteczności w kombinowanej terapii przeciwnowotworowej. W badaniach wykorzystano komórki nowotworowe jajnika – ludzka linia A2780 oraz piersi – ludzka linia MCF-7, a także zdrowe fibroblasty jajnika – linia HOF, oraz piersi – linia HMF, które głównie posłużyły do tworzenia zrębu dla komórek nowotworowych w badaniach wielowarstwowych. W badaniach sprawdzono cytotoksyczność, jak i fototoksyczność wykorzystanego fotouczulacza na komórki zdrowe oraz nowotworowe, zarówno w hodowli komórkowej stacjonarnej na płytkach wielodołkowych, oraz w przepływie w specjalnie zaprojektowanych i opatentowanych komorach mikroprzepływowych. Doktorantka zaproponowała 3 różne typy układów mikroprzepływowych do hodowli komórkowych: 1-typ) do badań dwuwymiarowych (tzw. 2D) hodowli komórkowych w przepływie, 2- i 3-typ) do badań trójwymiarowych (tzw. 3D) modeli komórkowych w przepływie. W 2-typie układu mikroprzepływowego komórki zdrowe i nowotworowe zostały naniesione na siebie jako kolejne warstwy w hodowli. Z kolei w 3-typie układu mikroprzepływowego wykorzystano membranę PET, by móc hodować komórki zdrowe po jednej stronie membrany, a komórki nowotworowe po drugiej stronie membrany. Przeprowadzone badania przepływowe oddziaływań zdrowych fibroblastów pełniących funkcje zrębu oraz komórek nowotworowych wykazały, że obecność zrębu wpływa stymulująco na proliferację komórek rakowych.

Doktorantka by móc zastosować w swoich układach przykład skojarzonej fotochemioterapii, wykorzystwała oprócz fotouczulacza lek o charakterze przeciwnowotworowym – doksorubicynę. Przeprowadzono ocenę cytotoksyczności doksorubicyny zarówno na prawidłowych fibroblastach, jak i na komórkach nowotworowych zarówno w makroskali na płytkach wielodołkowych, jak i w warunkach mikroprzepływowych.

W tej części opisano również terapię kombinowaną (fotouczulacz + doksorubicyna) w trybie sekwencyjnym (podawano leki w przepływie w różnej kolejności) w hodowlach 3D. Badania te umożliwiły Autorce pokazanie, że: i) skojarzona fotochemioterapia może być stosowana w skutecznym leczeniu nowotworów ginekologicznych oraz, że ii) istotna jest kolejność podawania leków w terapii sekwencyjnej.

Nieścisłości jakie pojawiają się w części drugiej:

- Przy opisie medium wykorzystanym do hodowli komórkowej (str. 59) nie podano, czy udział procentowy jest wagowy, czy objętościowy.
- Uchwyt wykorzystywany podczas przeprowadzania eksperymentów nie został przedstawiony na Rys.II.4 w rozdziale 3 (str. 62), tylko na Rys.II.10 w rozdziale 4.
- Przy podawaniu parametrów frezowania (str.62) płytki PMMA, podano tylko średnicę freza i prędkość posuwu frezu, a zapomniano podać jeszcze do kompletu: prędkość obrotową wrzeciona (tzw. RPM) oraz liczbę zębów freza. Bez tych dodatkowych informacji nie można odtworzyć procedury frezowania.
- Przy opisie naświetlania fotomaski, przy metodzie fotolitograficznej (str.63), podano tylko czas naświetlania pod lampą UV, a zapomniano podać parametry lampy UV i odległość maski od źródła światła.
- Doktorantka przy opisie podawania komórek prawidłowych i nowotworowych do mikrosystemu II (str.65-66 oraz 112) opisuje, że stosunek gęstości komórek był 1:3 oraz, że ten stosunek został dobrany eksperymentalnie. Nie ma podanej informacji jak wyglądały te eksperymenty i co z nich wynikało. Nie ma również w tym miejscu żadnego odniesienia literaturowego.
- Pod koniec rozdziału 3.3 (str. 82), Doktorantka stwierdza, że skoro: „... uzyskane wyniki były zgodne z teoretycznym mechanizmem procedury PDT...” to „... działanie ROS było bezpośrednią przyczyną śmierci komórek nowotworowych po terapii fotodynamicznej.” Pani mgr inż. Magdalena Flont pokazała, że poziom wolnych rodników w komórkach nowotworowych jajnika wynosił  $114,2 \pm 18,1\%$  (w odniesieniu do kontroli). Recenzent w tym miejscu nie widzi podstaw do tak mocnego stwierdzenia. Obserwowany wzrost rodników nie jest nawet istotny statystycznie, aczkolwiek potwierdza zajście reakcji fotodynamicznej. Czy są dane literaturowe, do których można się odnieść i pokazać że przyrost wolnych rodników w komórkach o 20-30% może powodować istotne zmiany populacyjne? Czy może tam występować jeszcze inny mechanizm?
- W rozdziale 4.2.1 Autorka pokazuje, że odrzucono z dalszego testowania komory okrągłe, ponieważ uzyskiwany w nich rozkład komórek na powierzchni nie był jednorodny, tak jak wynikało to z obliczeń numerycznych. Z doświadczeń recenzenta wynika, że problem w tym przypadku może być związany ze zmianą geometrii takiej komory. Do wytworzenia układów mikroprzepływowych używany był elastyczny materiał (PDMS), dlatego komory w swojej centralnej części miały prawdopodobnie przewężenie, stąd też najwięcej komórek znajdowało się w centralnej części komory.
- Opisy rysunków Rys.II.16 i Rys.II.17 zawierają nieścisłości – nie ma na przykład opisu panelu C) rysunków.
- W opisie proliferacji komórek w modelach wielowarstwowych (str. 115) Doktorantka stwierdziła, że „komórki nowotworowe jajnika oraz piersi hodowane jako monowarstwy komórkowe w warunkach przepływowych dzieliły się intensywnie, a ich wzrost miał charakter wykładniczy.” Według recenzenta, pokazane wyniki na Rys.II.16 i Rys.II.17 nie potwierdzają tego wniosku. Wzrost wykładniczy można pokazać tylko w przypadku hodowli wspólnej komórek zdrowych i nowotworowych.



### **Odnosnie części trzeciej – Podsumowanie i wnioski**

W tej części Doktorantka w sposób zwarty i treściwy zawarła najważniejsze wnioski i krytyczne uwagi dotyczące uzyskanych przez siebie wyników.

### **Wniosek końcowy**

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Natalii Flont stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie. Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie i wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego zakresu nowoczesnych metod badawczych z wykorzystaniem dostępnych baz danych, a także świetne opanowanie umiejętności opracowania i prezentacji wyników oraz znajomość najnowszych prac i danych literatury światowej dotyczących problematyki podjętej w pracy doktorskiej. Obszar zainteresowań naukowych Pani mgr inż. Magdaleny Flont jest bardzo szeroki i wchodzi w zakres wielu dziedzin, takich jak chemia, biologia, biochemia, biofizyka, medycyna, czy mechanika.

W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej **o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Flont do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ze względu na oryginalność tematyki badawczej, nowatorstwo potwierdzone patentami i bardzo dobrymi publikacjami Doktorantki, interdyscyplinarne ujęcie badanego problemu oraz możliwość aplikacji uzyskanych wyników **rekomenduje Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej rozważenie możliwości wyróżnienia niniejszej rozprawy doktorskiej.** Wskazane przez recenzenta potknięcia/błędy/uchylenia należy uznać za nieistotne przy całościowej ocenie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Flont.

Recenzent,

.....  
Dr hab. Sławomir Jakieta, prof. uczelni