

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Szuplewskiej pt. "Badanie aktywności biologicznej i potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych dwuwymiarowych materiałów z grupy MXene"

Przedstawiona do recenzji praca została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu 9 prac naukowych. Badania składające się na doktorat Pani Aleksandry Szuplewskiej zostały przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem Prof. dr. hab inż. Michała Chudego. Praca została opatrzona autoreferatem, w którym Doktorantka wprowadza Czytelnika w tematykę pracy, przedstawia cel i formułuje hipotezy, które weryfikowała w ramach prowadzonych badań.

Tematyka pracy doskonale wpisuje się w problematykę najnowszych badań nad biologicznym wykorzystaniem materiałów 2D w medycynie. Jest to dziedzina bardzo młoda zważywszy na fakt, że materiały z grupy MXenes, które są przedmiotem badań prowadzonych przez mgr Aleksandrę Szuplewską, zostały opisane po raz pierwszy w publikacji Gogotsi i wsp. w roku 2011. Unikalne właściwości tych związków pozwalają na niezwykle szerokie ich wykorzystanie w biomedycynie m.in. do celów diagnostycznych, jako materiały o właściwościach przeciwbakteryjnych, jako biosensory czy nawet w inżynierii tkankowej. Niewątpliwie jednak to właśnie potencjał przeciwnowotworowy, zwłaszcza związany z użyciem ich w terapii fototermicznej budzi ogromne nadzieje na przyszłość.

W ramach rozprawy doktorskiej autorka załączyła 8 publikacji eksperymentalnych oraz jedną pracę przeglądową. Prace są wieloautorskie. Mgr Aleksandra Szuplewska jest pierwszym autorem w dwóch pracach eksperymentalnych oraz w jednej pracy przeglądowej. W pozostałych publikacjach jest drugim (4 publikacje) lub trzecim (2 publikacje) autorem. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF od 14.343 do 3.057, sumaryczny IF 62,395). Udział doktorantki w opublikowanych i tworzących doktorat pracach dotyczył badań nad wpływem związków MXenes na przeżywalność komórek hodowanych *in vitro*, indukcję reaktywnych form tlenu, cykl komórkowy oraz programowaną śmierć komórki. Ponadto mgr Aleksandra Szuplewska brała czynny udział w opracowaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptów, co dowodzi jej istotnego zaangażowania w powstawanie prac, których jest współautorem. Fakt ten znajduje potwierdzenie w oświadczeniach współautorów dołączonych do publikacji tworzących cykl prac będący podstawą doktoratu. Tym niemniej w żadnej z publikacji składający się na cykl prac przedstawionych do recenzji Doktorantka nie była wiodącym autorem, czego oczekiwałabym po doktoracie przygotowanym w oparciu o publikacje. Warto zwrócić uwagę, że Pani mgr Aleksandra Szuplewska jest bardzo aktywnym naukowcem o bogatym dorobku, który oprócz ocenianych przez mnie prac, obejmuje również trzy publikacje, w tym jedną pierwszoautorską, w czasopismach międzynarodowych, dwie publikacje książkowe oraz szereg doniesień zjazdowych. W zdecydowanej większości doniesień Doktorantka jest pierwszym autorem.

Głównym celem prowadzonych przez Doktorantkę badań było określenie właściwości cytotoksycznych oraz potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych *in vitro* nowej rodziny nanokryształów, 2D węglików i azotków lekkich metali przejściowych, głównie tytanu. Aby osiągnąć zamierzony cel Doktorantka sformułowała sześć hipotez, które poddawała weryfikacji w toku prowadzonych badań. Zarówno cel badań jak i hipotezy badawcze są bardzo jednoznacznie sformułowane i nie pozostawiają wątpliwości, jakie problemy naukowe Doktorantka planuje rozwiązać. Oczywiście wyznaczenie celu oraz hipotez zostało poprzedzone analizą zgromadzonej do tej pory wiedzy, którą to analizę Autorka przedstawiła w zwięzłej, choć wyczerpującej formie we wprowadzeniu umieszczonym w autoreferacie. Na podstawie tego fragmentu pracy Czytelnik może zapoznać się z podstawowymi informacjami dotyczącymi wykorzystania MXenes w badaniach biologicznych, głównie związanych z terapią przeciwnowotworową, ale również dowiedzieć się, w jakim zakresie badania podjęte przez mgr Aleksandrę Szuplewską mogą poszerzyć lub uzupełnić wiedzę w tym temacie. W mojej ocenie jest to bez wątpienia niezwykle ciekawe zagadnienie dlatego w pełni rozumiem wybór tematu i potrzebę realizacji badań, których podjęła się Doktorantka.

Analizy przeprowadzone w ramach doktoratu przez mgr Szuplewską zostały zaplanowane z dużym rozmachem. W badaniach wykorzystano sześć różnych linii komórkowych, które reprezentowały zarówno komórki prawidłowe – keratynocyty (HaCaT), fibroblasty (MRC-5) oraz komórki nabłonkowe gruczołu piersiowego (MCF-10A), jak i komórki nowotworowe – komórki czerniaka (A375), komórki raka płuc (A549) oraz komórki raka piersi (MCF-7). Dzięki tak dobranym liniom możliwe było jednoczesne porównywanie wpływu badanych związków na komórki prawidłowe jak i nowotworowe, co w założeniu służyło określeniu specyficzności działania nanopłatków MXenes nakierowanego na komórki nowotworowe. W tym miejscu, jako biolog, chciałabym zwrócić uwagę, że zarówno w autoreferacie jak i w niektórych publikacjach został zastosowany zbyt duży skrót w opisie materiału biologicznego. Nieprawidłowym jest sformułowanie „komórki skóry”, „komórki piersi” czy „komórki płuc” w odniesieniu do komórek prawidłowych. Wszystkie te narządy mają budowę złożoną a tworzące je komórki pochodzą z różnych tkanek. Należy również zdawać sobie sprawę, że porównując, na przykład, komórki MRC-5 z komórkami linii A549 tak naprawdę porównujemy fibroblasty z komórkami nabłonkowymi, a więc komórki o różnym pochodzeniu tkankowym. Warto zatem zachować odpowiednią precyzję zarówno w opisie jak i w interpretacji uzyskanych wyników.

W badaniach *in vitro* testowano nanokryształy 2D węglików i azotków lekkich metali przejściowych. Uwzględniając ich modyfikacje przebadano 15 różnych materiałów typu MXenes. W każdym przypadku przynajmniej część badań, głównie dotycząca określenia cytotoksyczności oraz produkcji RFT, była prowadzona w szerokim zakresie stężeń. W ramach wykonanych doświadczeń analizowano wpływ modyfikacji dotyczących: sposobu syntezy, składu chemicznego powierzchni, stechiometrii, obecności określonego metalu przejściowego (niobu lub wanadu), zamianę atomu węgla na inny pierwiastek X w strukturze oraz zastosowanie terapii fototermicznej na aktywność biologiczną MXenes. Do badań Doktorantka wykorzystwała określony, podstawowy zestaw technik eksperymentalnych, takich jak powszechnie stosowany test żywołności komórek - test MTT, barwienie komórek kalceiną AM i jodkiem propidyny, analizę poziomu RFT oraz w ograniczonym zakresie analizę cyklu komórkowego, analizę apoptozy oraz potencjału mitochondriów. Badania z wykorzystaniem testów biochemicznych zostały wzbogacone o wizualizacje dokonanych za pomocą technik mikroskopowych, głównie mikroskopii

skaningowej. Można zatem bez wątplenia stwierdzić, że badania zostały odpowiednio zaplanowane, aby móc zweryfikować postawione przez doktorantkę hipotezy.

Przeprowadzone przez mgr Aleksandrę Szuplewską badania wykazały, że:

1. mikroplątki Ti_3C_2 są toksyczne dla komórek i prowadzą do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych;
2. mikroplątki Ti_3C_2 poddane utlenianiu termicznemu są bardziej toksyczne dla komórek nowotworowych a termiczne utlenienie powierzchni obniża potencjał prooksydacyjny dwuwymiarowego węgliku tytanu. A zatem możliwe jest sterowanie cytotoxycznoscia struktur z rodziny MXenes poprzez warunki syntezy i kontrolowanego utleniania materiału.
3. Zmiana ładunku powierzchniowego materiału 2D z ujemnego na dodatni wpływa na obniżenie efektu cytotoxycznego względem komórek prawidłowych lecz nie miała wpływu na żywotność komórek nowotworowych. Ponadto materiał 2D o dodatnim ładunku powierzchniowym indukuje powstawanie większej ilości reaktywnych form tlenu w komórkach nowotworowych przy jednoczesnym braku wpływu na żywotność.
4. Materiały z grupy MXenes mogą w znaczący sposób wpływać na zdolność komórki do replikacji materiału genetycznego;
5. Właściwości bioaktywne dwuwymiarowych węglików z grupy MXenes o tym samym składzie chemicznym ale różnej stechiometrii nie różnią się istotnie;
6. węgliki wanadu wykorzystane do tworzenia struktur 2D charakteryzują się dużą cytotoxycznoscia oraz że 2D V_2C oraz tlenki wanadu (VO_2 , V_2O_5) wpływają na cykl komórkowy;
7. Powlekanie nanopłatek poli-L-lizyną poprawia biokompatybilność wobec komórek prawidłowych, wpływa natomiast na znaczący spadek przeżywalności komórek czerniaka, co wskazuje, że zmiany ładunku powierzchniowego i wymiarów przestrzennych płatek mają istotny wpływ na charakter interakcji pomiędzy badanymi MXenes a błonami komórkowymi;
8. Węgliki niobu powlekane poli-L-lizyną wprowadzają komórkę w stan programowanej śmierci;
9. W przeciwieństwie do węglików tytanu i wanadu, węgliki niobu prowadzą do obniżenia poziomu RFT (stres redukcyjny);
10. Atom X w ograniczonym stopniu decyduje o charakterze oddziaływania między MXenes a komórkami.

Za szczególnie interesujące i mające znaczący potencjał aplikacyjny uważam wyniki przedstawione w oddzielnym rozdziale autoreferatu i dotyczące badań *in vitro* nad wykorzystaniem związków MXenes w terapii fototermicznej (PTT). W oparciu o dokonaną charakterystykę właściwości fototermicznych doktorantce udało się wytypować dwuwymiarowy węgiel tytanu modyfikowany glikolem polietylenowym jako potencjalnie najbardziej obiecujący związek do zastosowania w PTT. Wykazała również, że materiał ten w stosunkowo niskim stężeniu wykazuje znaczącą cytotoxycznosc po naświetleniu w stosunku do komórek czerniaka przy jednocześnie zachowaniu stosunkowo niskiej toksycznosci do keratynocytów linii HaCaT. Co ciekawe takie zastosowanie 2D węgliku tytanu okazało się nieskuteczne do selektywnego zabijania komórek raka piersi.

Niestety bardzo bogata w informacje część dotycząca wyników nie została w autoreferacie spuentowana syntetycznie sformułowanymi wnioskami, które pomogłyby w jednoznacznej ocenie uzyskanych wyników. Co prawda w tekście znajdują się fragmenty, które wyróżnione przez doktorantkę, stanowią podsumowanie uzyskanych wyników. Moją one jednak różny stopień uszczegółowienia oraz są dość liczne. Uważam, że nie mogą one zastąpić wniosków i prosiłabym o ich uzupełnienie podczas obrony.

Analizując wyniki przedstawione w autoreferacie oraz te zawarte w publikacjach mam kilka uwag krytycznych.

1. Analiza cyklu komórkowego została przeprowadzona w sposób nieprawidłowy. Przedstawione histogramy nie mogą stanowić podstawy do określenia odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu, co umożliwiłoby wykazania wpływu określonego czynnika na proliferację komórek. Niestety, trudno jest jednoznacznie stwierdzić co jest tego przyczyną gdyż opis procedury związanej z barwieniem i pomiarem w dwóch publikacjach różni się dlatego proszę o przedstawienie tej informacji.
2. Mam zastrzeżenia do analizy statystycznej uzyskanych wyników. Przede wszystkim większość danych nie została poddana weryfikacji z użyciem testu statystycznego (55 wykresów ogółem w publikacjach – 35 bez analizy statystycznej) lub dane były przeanalizowane statystycznie, lecz poziom istotności statystycznej nie został oznaczony na wykresach tak jak to ma miejsce w pracy *Jastrzębska et al., ACS Sustainable Chemistry & Engineering (2020)*. Uważam, że taka analiza jest szczególnie istotna w sytuacji gdy badając wpływ określonego związku chcemy udowodnić, że wrażliwość jednych komórek jest większa od innych. Dlatego też należałoby porównać komórki nowotworowe z odpowiadającymi im komórkami prawidłowymi (np. HaCaT *versus* A375 czy MRC-5 *versus* A549) i dopiero po wykazaniu istotnie statystycznej różnicy wnioskować o ukierunkowanym na konkretne komórki działaniu badanego związku. Podobnie należałoby zrobić gdy porównujemy wpływ modyfikacji nanopłatków na właściwości cytotoksyczne tych materiałów. Wówczas analizie statystycznej powinno się poddać wyniki uzyskane na jednej linii komórkowej przy zastosowaniu dwóch materiałów (modyfikowany *versus* niemodyfikowany). Proszę o wykonanie takiej analizy dla dwóch wybranych związków lub ich modyfikacji i zaprezentowanie pod czas obrony.

Uważam, że bardziej odpowiednią formą analizy danych dotyczących cytotoksyczności jest wyznaczenie krzywej przeżywalności i określenie na jej podstawie dawki IC₅₀. Pozwoliłoby to na jednoznaczne wykazanie ewentualnych różnic we wrażliwości komórek prawidłowych i nowotworowych.

3. Omówione w autoreferacie wyniki są w pewnych przypadkach nadinterpretowane np. autorka stwierdza „brak efektu cytotoksycznego mikrofrakcji Ti₃C₂ względem komórek prawidłowych skóry i płuc w całym zakresie badanych stężeń” oraz dalej “znaczącą toksyczność wobec komórek nowotworowych” (rycina 3), przy czym obserwowany spadek żywotności w komórkach prawidłowych wynosił do ok. 30% podczas gdy w przypadku komórek nowotworowych o ok. 40%. Przy tak niewielkich różnicach mówienie generalnie o braku cytotoksyczności w stosunku do komórek prawidłowych oraz znaczącej toksyczności w stosunku do komórek nowotworowych uważam za nieuzasadnione.

Również wyciągnięcie wniosku tylko na podstawie przeprowadzonego testu MTT, że obserwowana wyższa cytotoksyczność mikrofrakcji węglików tytanu „wskazywać może na zwiększone powinowactwo materiału do błony komórkowej oraz na zdolność do efektywnego wnikania do wnętrza komórki i/lub upośledzenia wymiany substancji odżywczych oraz metabolitów między komórką a jej specyficznym mikrośrodowiskiem” jest absolutnie nieuzasadnione.

4. W badaniach dotyczących właściwości pro-oksydacyjnych nanopłatków wzrost RFT obserwowano po 24 godzinach, kiedy to część komórek umierała (co potwierdzono testem MTT). Śmierć komórek jest wynikiem znaczącej utraty homeostazy, która zwykle wiąże się z dysfunkcją mitochondriów oraz stresem oksydacyjnym. Z tego też powodu tak dramatyczny wzrost RFT względem kontroli (w niektórych przypadkach nawet 2-krotny) po podaniu badanych materiałów można uznać za skutek a nie koniecznie przyczynę obserwowanej cytotoksyczności.
5. W pracy Jastrzębska i wsp. *Journal of Hazardous Materials* (2017) analiza poziomu RFT wykazała bardzo duży wzrost RFT w komórkach linii A375 po podaniu 2D płatków Ti_3C_2 podczas gdy w pozostałych liniach komórkowych (prawidłowych HaCaT, MRC5 oraz nowotworowej A549) poziom RFT był zbliżony w każdym badanym stężeniu. Z kolei badanie cytotoksyczności wykazało większą wrażliwość (wyższą śmiertelność) komórek nowotworowych, skłaniając autorów do konkluzji, że badany materiał jest selektywny w stosunku do komórek nowotworowych. Czy zatem biorąc pod uwagę zarówno wyniki z oznaczenia poziomu RFT jak i cytotoksyczności uzasadnione jest dość ogólne stwierdzenie, że indukcja RFT jest odpowiedzialna za cytotoksyczne działanie badanych nanopłatków ?
6. Wątpliwości budzi również interpretacja badań przeprowadzonych na nanopłatkach modyfikowanych termicznie. Wynik analizy wskazuje, że taka modyfikacja prowadzi do zwiększonej cytotoksyczności materiału przy jednoczesnym obniżeniu zdolności do indukcji stresu oksydacyjnego w tych komórkach. Mgr Aleksandra Szuplewska stwierdza, że taki spadek poziomu RFT jest skutkiem obniżenia aktywności metabolicznej komórek po ekspozycji na utlenione płatki MXenes która wiąże się z obniżeniem żywotności (str.34 autoreferatu), podczas gdy ten sam wynik można by zinterpretować jako brak korelacji pomiędzy poziomem cytotoksyczności utlenianego MXenes a indukcją stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji mogłoby wskazywać, że nie zawsze albo nie głównie stres oksydacyjny jest odpowiedzialny za obserwowane efekty działania badanego materiału.

Powyższe uwagi zawarte przez mnie w punktach (3., 4., 5. i 6.) nie kwestionują wyników uzyskanych w trakcie realizacji projektu doktorskiego ale mają na celu zwrócenie uwagi na zbyt ogólne, czasami nie poparte odpowiednimi badaniami interpretowanie wyników i wyciąganie zbyt daleko posuniętych wniosków.

7. Ciekawym wynikiem uzyskanym przez doktorantkę jest zaobserwowany spadek poziomu RFT w komórkach poddanych działaniu węglików niobu, podczas gdy większość pozostałych materiałów MXenes prowadziły raczej do wzrostu RFT. Jakie mogłoby być wytłumaczenie tego zjawiska ?

8. Doktorantka przeprowadziła wizualizację z zastosowaniem mikroskopii skaningowej oddziaływania nanopłatków z komórkami. Na podstawie takich zdjęć został wyciągnięty wniosek, że komórki MCF-7 preferencyjnie internalizują nanonopłatki 2D Ti_2C-PEG . Czy faktycznie możliwe jest stwierdzenie internalizacji i to zwiększonej przy zastosowaniu tej techniki? Bardzo proszę o wskazanie tego na odpowiednich zdjęciach, gdyż trudno mi jest zinterpretować przedstawione wyniki.

Na koniec mam tylko drobną uwagę edytorską. Wydrukowanie pracy doktorskiej w tak niewielkim formacie bardzo znacząco utrudnia jej czytanie. Publikacje dołączone do autoreferatu podobnie jak i oświadczenia współautorów są praktycznie nieczytelne. Dokonanie przez mnie recenzji było możliwe tylko dzięki udostępnieniu mi pracy w wersji elektronicznej.

Podsumowując, niezależnie od wyrażonych powyżej uwag krytycznych pozytywnie oceniam pracę doktorską mgr Aleksandry Szuplewskiej. Uważam, że wysiłek podjęty w przeanalizowanie tak dużej liczby materiałów 2D znacząco wzbogaciło wiedzę dotyczącą potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych nanopłatków. Uzyskane wyniki stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych, pogłębionych badań, które będą mogły znaleźć praktyczne wykorzystanie w terapii. Pozostaje mi tylko mieć nadzieję, że zawarte w recenzji komentarze okażą się pomocne przy tworzeniu kolejnych publikacji w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Szuplewskiej spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. z 2016 r. poz. 882). Wnoszę zatem do Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani Aleksandry Szuplewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Grażyna Mosieniak

Instytut Biologii Doświadczalnej PAN
Im.M.Nenckiego