

## Opinia o rozprawie doktorskiej mgr Ilony Anety Dudek,

pt: „Ocena wybranych parametrów odpowiedzi immunologicznej limfocytów z krwi obwodowej w obecności grafenu”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Dariusza Szukiewicza w Katedrze i Zakładzie Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, II Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim oraz Oddziałem Fizjoterapii, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Grafen, główny bohater rozprawy doktorskiej, to „materiał przyszłości dla fizyki ciała stałego”, jak sugerowali nagrodzeni nagrodą Nobla w 2010 r dwaj fizycy - Andriej Geim i Konstantin Novoselov. Doktorantka, zafascynowana grafenem, dokładnie zapoznała się z dostępnymi opracowaniami i bardzo szczegółowo, a może nawet zbyt szczegółowo, omawia we Wstępie (liczącym 33 strony) wszystkie jego cechy, przytaczając opisujące je równania (wydaje mi się zbytecznie) i użyteczność technologiczną. Grafen jest dwuwymiarowym materiałem o grubości pojedynczego atomu węgla. Badania jego struktury wykazały, że jest to w przyrodzie materiał najbardziej wytrzymały, a równocześnie elastyczny i lekki. Ma doskonałe właściwości elektryczne i optyczne i są już zastosowania materiału w optomechanice. Potencjalnie grafen mógłby zastąpić krzem przy produkcji układów mikroprocesorowych, ale najnowsze informacje temu zaprzeczają - tranzystor grafenowy nie może przejść do trybu, w którym będzie całkowicie wyłączony. Możliwe wszakże są hybrydy grafen-krzem.

W kontekście rozprawy doktorskiej najbardziej istotne są oczywiście własności, które pozwalają na biomedyczne zastosowanie grafenu.

Grafen ma dużą powierzchnię i może być wykorzystany jako nośnik leków, np. w terapii nowotworów. Ale nie tylko; grafen może zostać wykorzystany do wytwarzania biosensorów pozwalających wykryć zmiany nowotworowe, choroby genetyczne, metaboliczne, czy zakażenia pasożytami (malaria), z czułością wielokrotnie wyższą niż konwencjonalne sensory. Potencjalnie grafen może być użyteczny w inżynierii tkankowej. Podnosi się też jego własności bakteriobójcze. Równocześnie jednak pojawiły się prace wskazujące na możliwą toksyczność i adsorpcję nanomateriałów

grafenowych przez białka osocza, co ogranicza ich natychmiastowe, praktyczne zastosowanie w klinice człowieka. Niezbędne są zatem badania, które pozwolą na zidentyfikowanie zagrożeń zdrowotnych oraz środowiskowych i umożliwią odpowiednie modyfikacje nanomateriałów, bowiem przegląd danych literaturowych nie pozostawia wątpliwości, że badania nad wpływem grafenu na organizm ludzki i środowisko są niedostateczne, a i ich wyniki często sprzeczne. Zatem cieszy fakt podjęcia przez mgr Ilonę Dudek w rozprawie doktorskiej badań nad odpowiedzią immunologiczną limfocytów ludzkich, hodowanych w obecności różnych dawek grafenu - w postaci wolnej, o różnej wielkości cząstek oraz grafenu związanego na krzemionce.

Limfocyty tworzą pierwszą linię obrony organizmu przed patogenami. Doktorantka izolowała je z krwi obwodowej ochotników, przy czym część badań prowadziła na hodowlach komórek całej populacji limfocytów, a część na komórkach wyodrębnionych frakcji: 1/ zawierającej tylko limfocyty cytotoksyczne, wykazujące ekspresję CD8+ (glikoroteiny przezbłonowej będącej ko-receptorem receptora limfocytów T) oraz 2/ zawierającej pozostałe limfocyty, nieposiadające tego antygenu (CD8-).

Badala wpływ grafenu na żywotność i aktywność limfocytów w hodowlach 24- i 72-godzinnych. Interakcję grafen-limfocyt oceniała ponadto przy użyciu mikroskopu świetlnego i elektronowego skaningowego, analizując preparaty z komórek inkubowanych przez 72 godziny z różnymi stężeniami grafenu.

Jako wskaźniki toksycznego działania grafenu na limfocyty przyjęła aktywację układu dopełniacza C5a i aktywację stresu oksydacyjnego, mierzonego aktywnością mieloperoksydazy oraz kaspazy 9 jako markera apoptozy, natomiast jako wskaźnik genotoksyczności przyjęła stopień uszkodzenia DNA, mierzony stężeniem histonu gamma H2AX ( $\gamma$ -H2AX). Pomiaru stężenia C5a i stężenia mieloperoksydazy dokonywała w supernatancie, natomiast pomiaru stężenia kaspazy 9 oraz histonu gamma H2AX ( $\gamma$ -H2AX) w homogenacie hodowli limfocytów po 72 h, stosując właściwe, opracowane dla tych markerów, metody immunoenzymatyczne ELISA.

Szczegółowy opis postępowania w każdej z procedur badawczych znajdujemy w rozdziale Materiały i metody (14 stron)

Mgr Dudek wykonała bardzo dużo oznaczeń, gdyż badania obejmowały 4 rodzaje grafenu, tj. A02, A03, A04 i osadzonego na krzemionce, każdy użyty w dawce 0,5 ng, 1,0 ng, 1,5 ng; 5,0 ng, 10 ng, 15 ng; 50 ng a nawet 100 ng.

Rezultaty, które Doktorantka uzyskała, zostały zawarte w 13 tabelach, przedstawione na 35 rycinach i szczegółowo omówione w rozdziale Wyniki, który obejmuje łącznie 49 stron. Na marginesie, załączenie w formie stabelaryzowanej wyników testów Anova nie wydaje mi się konieczne, a podawanie dwóch miejsc po przecinku w przypadku dziesiątków-, czy setek tysięcy komórek jest nieporozumieniem. Dalej, zasadą jest, że wyniki prezentowane są raz; Ryc. 41-44 są zbyteczne, a nieumieszczenie na nich wartości kontrolnych daje fałszywy obraz tego, co zostało zamieszczone w Tabelach 15-18. Wreszcie, jeżeli konstruuje się Spis Tabel, nie ma potrzeby podawania za każdym razem Tabela, nr i tytuł, wystarczy podać nr i tytuł. To samo odnosi się do rycin.

Obszerna dyskusja (10 stron) pokazuje, że mgr Dudek zna dobrze opublikowany przez innych autorów materiał doświadczalny i dość swobodnie się po nim porusza interpretując uzyskane przez siebie wyniki.

W tym miejscu warto dodać, że w rozprawie zacytowano 196 pozycji piśmiennictwa. Gros tych publikacji, bo prawie 3/4, ukazało się w latach 2009-2016. Świadczy to, że podjęte w rozprawie zagadnienia są aktualnie obiektem zainteresowania badaczy; są na czasie.

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Dudek sformułowała następujące wnioski, z którymi wypada się zgodzić:

- Na mechanizm interakcji grafenu z komórkami znaczący wpływ mają wielkość powierzchni właściwej i rozmiar nanocząstek grafenu. Tak więc, A02 i A03 o małych nanocząstkach charakteryzowały się wyższą cytotoksycznością niż grafen A04 o dużych nanocząstkach. Najwyższe stężenia MPO i  $\gamma$ -H2AX, obserwowano przy tym po inkubacji z grafenem A03.
- Grafen, niezależnie od zastosowanej postaci, nie wpływał w istotny sposób na stopień aktywacji układu dopełniacza wyrażony stężeniem składnika C5 tego układu.

- Silna adsorpcja składników pożywki hodowlanej i komórek do powierzchni nanocząstek sugeruje chemotaktyczny wpływ grafenu na badane komórki.
- Prawdopodobnie nanocząstki grafenu o małych rozmiarach i dużej powierzchni właściwej, silniej aktywują stres oksydacyjny, co w konsekwencji doprowadza do zaburzenia struktury DNA komórki.
- Na podstawie analizy profilu wydzielania IL10, IL4, IL6 i TNF- $\alpha$  można wywnioskować, że:
  - w zależności od powierzchni właściwej, jak i wielkości nanocząstek, grafen może tłumić lub wzmacniać odpowiedź immunologiczną,
  - grafen o małych rozmiarach nanocząstek i dużej powierzchni właściwej, poprzez silny wpływ na produkcję cytokin prozapalnych jest znacznie bardziej immunotoksyczny w porównaniu z grafenem o dużych nanocząstkach,
- Czas inkubacji jest parametrem najsilniej wpływającym na toksyczność grafenu,
- Grafen A04 i GrSiO<sub>2</sub> są najbezpieczniejszymi formami grafenu w odniesieniu do limfocytów ludzkich. Można zatem wnioskować, że grafen o dużych rozmiarach, jak i grafen osadzony na ciele stałym są najbardziej biokompatybilnymi formami wobec tych komórek.

Wnioski są względnie poprawne i pozwalają stwierdzić dojrzałość badawczą Doktorantki.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Ilony Anety Dudek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Doktorantka wykazała się w niej zarówno wiedzą teoretyczną, jak i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych, w których, dla osiągnięcia wytyczonego celu, zastosowała adekwatne metody. Uzyskane w realizacji prac eksperymentalnych wyniki odniosła mgr Dudek do rezultatów innych autorów, a wyciągnięte przez nią wnioski potwierdzają w części sygnalizowane wcześniej obawy.

Rozprawa spełnia zatem wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w

zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595, ze zm.) oraz § 6 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady II Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim oraz Oddziałem Fizjoterapii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Ilony Anety Dudek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Łódź, 24 stycznia 2019