



Dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Ul. Norwida 25,
50-375 Wrocław

Wrocław, 10.09.2022

Ocena

pracy doktorskiej mgr Kamili Białkowskiej na temat: „Opracowanie i wdrożenie metod badawczych do oceny wpływu materiałów na komórki hodowane w hodowlach 3D na przykładzie wykorzystania dendrymerów jako nośników siRNA”

Rozprawa doktorska przedstawiona mi do oceny na podstawie decyzji Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 28.06.2022, dotyczy opracowania i wdrożenia nowej metody 3D znajdującej zastosowanie w hodowlach komórkowych. Hodowle komórkowe są powszechnie stosowane w badaniach biologicznych. Stanowią najczęściej pierwszy etap badań, mających na celu określenie mechanizmów komórkowych, w tym skutków oddziaływań różnych, często nowych, substancji z organizmem żywym. Komórki w hodowlach muszą mieć zapewnione odpowiednie warunki fizykochemiczne, aby mogły utrzymywać swoje funkcje życiowe i dobrze pełnić rolę uproszczonego modelu organizmu. Najczęściej komórki pozyskane bezpośrednio z tkanek lub z linii komórkowych są nanoszone na płaskie powierzchnie naczyń hodowlanych na odpowiednie podłoże. W ten sposób tworzą dwuwymiarową monowarstwę komórkową 2D. Model hodowli komórkowych 2D jest z powodzeniem stosowany w badaniach naukowych od lat 40 XX wieku, między innymi do oznaczania cytotoksyczności nowych substancji chemicznych i potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Komórki w organizmie funkcjonują jednak w środowisku trójwymiarowym, co jest kluczowe z punktu widzenia utrzymania ich funkcji życiowych. Fenotyp i funkcje komórek zależą silnie od interakcji komórki z innymi komórkami, macierzą zewnątrzkomórkową i białkami. Zatem model badawczy hodowli komórkowych 3D znacznie lepiej będzie odzwierciedlał mikrośrodowisko i warunki naturalne dla poszczególnych komórek hodowlanych. Interakcje pomiędzy komórkami oraz między komórkami a środowiskiem zewnętrznym różnią się zatem w hodowlach 2D i 3D. Ponadto wyników badań cytotoksyczności prowadzonych na hodowlach 2D nie można odnieść bezpośrednio do wyników uzyskanych *in vivo* dla żywego organizmu. Jak pokazują wyniki badań naukowych prowadzonych na hodowlach 3D są one bardziej zbliżone do tych uzyskanych w badaniach doświadczalnych *in vivo* na zwierzętach.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

W przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej pani mgr Kamila Białkowska podjęła się trudnego zadania opracowania metody, pozwalającej na określenie wpływu różnych substancji na komórki hodowane w technologii 3D, a następnie wdrożenie opracowanej metody hodowli 3D do oferty usług „Bionanoparku” Sp. z o. o. W przedstawionej do oceny pracy Doktorantka przetestowała opracowaną przez siebie metodę badawczą 3D na linii komórkowej raka piersi MCF-7, które zostały poddane działaniu kompleksów dendrymerów CBD-1 i CBD-2 z siRNA (Mel-1 i Bel-2). Badania dotyczące cytotoksyczności tych kompleksów zostały przeprowadzone najpierw na hodowlach komórkowych 2D i potwierdzone w hodowlach komórkowych 3D, według nowej metody opracowanej przez Doktorantkę.

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu MNiSW pt. „Doktorat wdrożeniowy” pod kierunkiem promotora pracy pani dr hab. Katarzyny Miłowskiej, prof. UŁ oraz promotora pomocniczego pana dr inż. Piotra Komorowskiego. Doktorantka wykonała badania naukowe w Katedrze Biofizyki Ogólnej, Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz we współpracy z Katedrą Chemii Organicznej i Nieorganicznej Uniwersytetu Alcalá w Hiszpanii. Wdrożenie nowej metody badań na hodowlach komórkowych 3D zostało wprowadzone do oferty usług w firmie „Bionanopark” Sp. z o.o.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech spójnych tematycznie prac: jednej pracy przeglądowej i 2 oryginalnych prac doświadczalnych. Dotyczą one przeglądu metod prowadzenia hodowli komórkowych w technologii 3D oraz sprawdzenia cytotoksyczności dendrymerów jako nośników siRNA w hodowlach komórek linii MCF-7 prowadzonych zgodnie z opracowaną przez Doktorantkę metodą w hodowli 3D w odniesieniu do cytotoksyczności w powszechnie stosowanej hodowli 2D. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* o zasięgu międzynarodowym. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Białkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Miłowska K., Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(17):6225,

2. Białkowska K., Miłowska K., Michlewska S., Sokołowska P., Komorowski P., Lozano-Cruz T., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and Their siRNA Complexes with MCF-7 Cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(13):7097,

3. Białkowska K., Komorowski P., Gomez-Ramirez R., de la Mata F.J., Bryszewska M., Miłowska K. Interaction of Cationic Carbosilane Dendrimers and Their siRNA Complexes with MCF-7 Cells Cultured in 3D Spheroids; *Cells*, 2022, 11: 1697,

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 18.448 oraz 420 punktów MEiN.



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Do rozprawy doktorskiej zostały również dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach oraz pozostały dorobek naukowy pani mgr Kamili Białkowskiej. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest dominujący i stanowi odpowiednio 80, 55 i 70 %. Ponadto z oświadczeń współautorów prac wynika, że pani mgr Kamila Białkowska uczestniczyła aktywnie na etapie planowania i wykonywania badań, które następnie potrafiła opracować i opisać w formie publikacji. We wszystkich pracach, jako autor korespondencyjny, uczestniczyła w procesie wydawniczym odpowiadając na recenzje prac i korespondując z edytorami. Duże zaangażowanie Doktorantki zarówno w proces badawczy, jak i publikacyjny na każdym etapie ich realizacji, świadczy o dojrzałości naukowej pani mgr Białkowskiej.

O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy także Jej dorobek naukowy, który zgromadziła poza pracami składającymi się na rozprawę doktorską, a który stanowią dwa artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR (odpowiednio 100 i 140 pkt MEiN oraz IF 3.315, 3.368). Jest również współautorką 5 prezentacji ustnych przedstawionych na 5 konferencjach naukowych, w tym dwóch konferencji online oraz jednej konferencji międzynarodowej, na której zdobyła wyróżnienie abstraktu. Należy podkreślić, że sumaryczny IF dorobku publikacyjnego łącznie z pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 25.131 oraz 660 pkt MEiN. Doktorantka ponadto uczestniczyła w stażu naukowym na Uniwersytecie w Atenach w czerwcu 2019, w ramach Projektu PROM na Uniwersytecie Łódzkim finansowanym przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. Doktorantka uczestniczyła również w dwóch projektach badawczych. Dorobek naukowy pani mgr Białkowskiej, świadczy zatem o dużym potencjale naukowym Doktorantki i oceniam go bardzo wysoko.

Na rozprawę doktorską pani mgr Kamili Białkowskiej składają się następujące podrozdziały: zebrany dorobek naukowy Doktorantki, wstęp, cele pracy, opracowanie metod pozwalających na określenie wpływu substancji/materiałów/związków na komórki hodowane w 3D, omówienie prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, podsumowanie, wnioski, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, bibliografia, prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i oświadczenia współautorów. Praca zatem zawiera wszystkie niezbędne elementy wymagane w pracach doktorskich.

W rozprawie doktorskiej pani Białkowska poprawnie zacytowała 30 pozycji literaturowych, z których 29 stanowią publikacje obcojęzyczne i 1 publikacja w języku polskim. Zgromadzona literatura to publikacje z ostatnich 14 lat, które bezpośrednio dotyczyły poruszanych w pracy zagadnień. We wstępie Doktorantka w sposób syntetyczny omówiła zagadnienia związane z hodowlą komórek w technologii 2D i 3D oraz zastosowanie nowo opracowanej metody hodowli



komórek w technologii 3D do badań nad wpływem kompleksów dendrymerów z siRNA na komórki raka piersi MCF-7.

W drugim podrozdziale Doktorantka szczegółowo omówiła cel wdrożeniowy i badawczy pracy doktorskiej. Została również postawiona hipoteza badawcza i określone szczegółowo zadania i metody badawcze służące realizacji celu badawczego i wdrożeniowego rozprawy doktorskiej. Celem wdrożeniowym pracy było opracowanie metody pozwalającej na ocenę wpływu testowanych związków na komórki w hodowli 3D. Cel został zrealizowany poprzez szereg wykonanych przez Doktorantkę testów dla 3 linii komórkowych wykonanych na podłożu hydrożelowym, w celu uzyskania optymalnych warunków hodowli komórek w technologii 3D. Opracowana metoda została szczegółowo opisana w rozdziale 3 i wdrożona do oferty usług „Bionanopark” sp z o.o. Doktorantka ponadto opisała podjęte próby zastosowania testów MTT, XTT oraz testu uszkodzeń DNA do hodowli 3D, które nie dały oczekiwanych rezultatów. Podejmowanie takich prób badawczych i opisanie również tych eksperymentów, które nie dały zadowalających wyników świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki.

W opisanej bardzo syntetycznie przez Doktorantkę metodzie zainteresowało mnie kilka szczegółów, których nie znalazłam w opisie:

- w jakich warunkach fizycznych były prowadzone hodowle (temperatura, wilgotność, ciśnienie) ?
- czy na hodowlach Saos-2 i EA.hy926 były również przeprowadzane testy cytotoxycności?
- do testów przeżywalności komórek hodowle 3D rozbijano na pojedyncze komórki, czy zastosowana metoda z roztworem trypsyny-EDTA nie powodowała uszkodzeń komórek?
- czy trypsyna-EDTA nie zakłócała cytometrycznych testów przeżywalności poprzez autofluorescencję?
- czy wszystkie testowane przez Doktorantkę linie komórkowe (MCF-7, Saos-2 i EA.hy926) są włączone jako wdrożenie do oferty „Bionanoparku” ?
- popularne dla hodowli 2D testy XTT, MTT oraz test uszkodzeń DNA nie dały oczekiwanych rezultatów, jakie mogły być tego powody?

Mała uwaga i komentarz do tej części pracy. Warto zwrócić uwagę na zdjęcia wykonane pod mikroskopem konfokalnym str. 14 i 15, ilustrujące uzyskane hodowle komórkowe. Mimo dobrej jakości fotografii, na części z nich niestety zabrakło menzurki, co pozwala jedynie na zgrubną ocenę jakościową pozyskanych hodowli, gdyż bez liniału zdjęcia nie mają wartości naukowej.

Cel badawczy został zrealizowany z zastosowaniem szeregu znanych metod badawczych tj.: pomiar potencjału zeta, dichroizm kołowy, elektroforeza, mikroskopia konfokalna oraz testy cytometryczne (przeżywalności, ruchliwości, apoptozy, transportu). Wybrane metody badawcze



są stosowane w celu oceny toksyczności związków i stanowią bogaty warsztat badawczy stąd ich wybór przez Panią mgr Białkowską jest w pełni uzasadniony. Przeprowadzone badania miały na celu porównanie cytotoksyczności kompleksów dendrymerów z siRNA na hodowlach 2D i 3D linii komórkowej MCF-7. Zastosowany przez Doktorantkę w badaniach szeroki warsztat eksperymentalny pozwolił w pełni zrealizować cel badawczy pracy poprzez zebranie wyników dotyczących szeregu istotnych parametrów biofizycznych badanych komórek oraz ocenę stopnia ich przeżywalności i żywotności po zastosowaniu badanych dendrypleksów.

Zastanowiło mnie w tej części pracy:

- czy zostały określone rozmiary badanych dendrypleksów?
- czy badane kompleksy dendrymerów z siRNA wykazywały autofluorescencję, która stanowi poważne ograniczenie w stosowanej w pracy metodzie cytometrycznej?

W podrozdziale czwartym pani mgr Kamila Białkowska omówiła publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, szczegółowo omawiając wyniki uzyskane z części badawczej pracy doktorskiej, wskazując jako podsumowanie w 5 podrozdziale na wdrożenie metody hodowli komórkowej 3D do badań naukowych. Wykazała również, że dendrymery transportują siRNA do wnętrza komórek i w zależności od stężenia wykazują efekt cytotoksyczny. Dla komórek w hodowli 3D stężenia cytotoksyczne dendrypleksów są wyższe niż dla hodowli 2D, a kompleks z dendrymerem CBD-1 wykazał największą cytotoksyczność dla komórek MCF-7.

Sformułowane na podstawie wykonanych badań wnioski oraz opracowanie i wdrożenie metody hodowli komórek 3D stanowią w mojej ocenie oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Opracowana przez panią mgr Białkowską metoda jest nowym i ważnym wdrożeniem w metodologię badań cytotoksyczności wykonywanych na hodowlach komórkowych 3D, stanowiących laboratoryjny model badawczy najbardziej zbliżony do warunków naturalnych organizmu. Ponadto ważnym osiągnięciem naukowym jest wniosek z przeprowadzonych badań, dotyczący przydatności dendrypleksu CBD-1 w transporcie siRNA do komórek nowotworu MCF-7, co wskazuje na potencjalne zastosowanie kompleksu w terapii przeciwnowotworowej raka piersi. W tym miejscu mam pytanie do pani mgr Białkowskiej, czy ma w planach kontynuację badań na innych liniach komórkowych w hodowlach 3D oraz czy są w planach badania przedkliniczne/kliniczne nad skutecznością dendrypleksów w terapii nowotworów?

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską pani mgr Kamili Białkowskiej jako wyróżniającą. Na jej dużą wartość merytoryczną składają się: umiejętnie zaplanowanie i przeprowadzenie wdrożenia metody do hodowli komórek 3D oraz nowatorskie badania opublikowane w renomowanych czasopismach, które dotyczą badań cytotoksyczności dendrypleksów, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Doktorantka wykazała się przy tym umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych oraz znajomością problematyki z zakresu technik prowadzenia hodowli komórkowych, biofizycznych technik



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

pomiarowych, a także farmakologii i cytobiologii. W swojej rozprawie przedstawiła oryginalne i nowoczesne badania, a także wdrożyła opracowaną przez siebie nową metodę na hodowlach komórkowych 3D, zatem Jej praca ma charakter nie tylko poznawczy, ale również aplikacyjny.

Rozprawa doktorska pani mgr Kamili Białkowskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami, jak również w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku. Uważam, że przedłożona mi do oceny rozprawa jest podstawą do nadania Doktorantce stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych.

Zwracam się, więc z uprzejmą prośbą do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Kamili Białkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę dorobek naukowy pani mgr Kamili Białkowskiej, zakres i jakość przeprowadzonych przez nią badań i wykonane wdrożenie, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i nagrodzenie Doktorantki.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa