



Dr hab. inż. Joanna Zeyland, prof. UPP
Katedra Biochemii i Biotechnologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 04/11/2022

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Konrada Kuczyńskiego

pt. Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach właściwości biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Katarzyny Rolle, prof. ICHB PAN oraz Pana Promotora pomocniczego dr. inż. Bartosza Grześkowiaka. Praca została wykonana w ramach programu: "Środowiskowe interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nanotechnologii", Projekt nr: POWR.03.02.00-00-I032/16. Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi pismo Pani dr Joanny Banasiak, Sekretarz Rady Naukowej ICHB z informacją, że w/w Rada Naukowa w dniu 07 września 2022 roku powołała moją osobę na Recenzenta rozprawy doktorskiej mgr. Konrada Kuczyńskiego pt. *Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach właściwości biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych*.

Wśród najczęstszych przyczyn śmierci na całym świecie prym wiodą choroby nowotworowe. Nowotwory złośliwe stanowią drugą przyczynę zgonów w Polsce. Szacunkowo na każde 100 tysięcy osób w 446 zdiagnozowano nowotwór. W roku 2019 nowotwory złośliwe były przyczyną ponad 25% zgonów mężczyzn i ponad 23% kobiet. W tym samym roku, w Krajowym Rejestrze Nowotworów odnotowano informacje o ponad 170 tysiącach nowych zachorowań na nowotwory i ponad 100 tysiącach zgonów z ich powodów. Dla osób w wieku od 25 do 64 lat nowotwory złośliwe stanowią istotny problem zdrowotny. Najbardziej narażone są kobiety do 65 roku życia, dla których nowotwory są najczęstszą przyczyną śmierci. Mężczyźni najczęściej zapadają na nowotwory prostaty, płuc oraz okrężnicy, a kobiety na nowotwory płuc, piersi oraz okrężnicy (wg biuletynu Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie PIB oraz Krajowego Rejestru Nowotworów pt. „Nowotwory złośliwe w Polsce w 2019 roku”). Według Krajowego Rejestru Nowotworów w Polsce, nowotwory mózgu stanowią 2% zachorowań na nowotwory złośliwe, a zachorowalność na nie wzrasta z wiekiem. Najwięcej zachorowań notuje się w grupie wiekowej między 50 a 64 rokiem życia. Najczęściej obserwowaną postacią nowotworu złośliwego mózgu są glejaki, przy czym 50% wszystkich glejaków stanowi glejak wielopostaciowy. W związku z faktem, że rokowania pacjentów z zdiagnozowanym glejakiem są złe i nadal brakuje nam skutecznych metod jego leczenia, tematyka podjęta w



pracy doktorskiej Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego wychodzi naprzeciw potrzebom współczesnej medycyny dając nadzieję lekarzom, ale przede wszystkim pacjentom.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska charakteryzuje się typowym układem dla opracowań monograficznych i powszechnie stosowanym w pracach doświadczalnych. Zawiera 131 numerowanych stron jednostronnego wydruku z podziałem na 8 numerowanych rozdziałów tj. wprowadzenie (dobrze byłoby dodać przymiotnik określający charakter wprowadzenia np. literaturowe, teoretyczne etc.), cel pracy, wyniki, dyskusja, wnioski, materiały i metody, literatura oraz załączniki (załącznik stanowi publikacja współautorstwa mgr. inż. Konrada Kuczyńskiego (DOI: 10.1111/jcmm.17428) – strony nienumerowane). Ponadto na pracę składają się: karta tytułowa, karta z podziękowaniami, spis treści, wykaz skrótów stosowanych w pracy, streszczenie w języku polskim oraz angielskim. W pracy zabrakło spisu tabel i rycin zamieszczonych w dysertacji, ponadto tabele zawarte w rozdziale 6. *Materiały i metody* nie mają numeracji.

Na stronie tytułowej pracy brakuje wskazania tytułu zawodowego Autora pracy i choć nie można tego traktować w kategoriach błędu, to jednak w całej pracy nie znajdujemy informacji, że Pan Konrad Kuczyński jest magistrem biotechnologii. Załączona w obecnej formie do monografii publikacja (załącznik 1) wprowadza Recenzenta w zakłopotanie, gdyż nie ma pewności czy traktować ją jako integralną i niezbędną część monografii, czy jednak nie. Publikacja widnieje w rozdziale 7. *Literatura*, w pozycji 35 i w opinii Recenzenta byłby to wystarczający sposób udokumentowania tego cytowania. Nieprecyzyjne wydają się w tym kontekście stwierdzenia w rozdziale 2. *Cel pracy*: „Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy została opublikowana, a publikacja ta jest załączona do tej pracy dyplomowej” oraz w rozdziale 3. *Wyniki*: „Wyniki zawarte w tej części pracy zostały opublikowane w roku 2022 w pracy, której jestem pierwszym współautorem [35]”. Należałoby za każdy razem, kiedy jest wzmianka o opublikowanej części badań podać przypis w postaci cytowania [35]. Rozwiązałyby to pewne problemy, o których wspominam później i nie byłoby potrzeby załączania pracy.

Wprowadzenie literaturowe obejmuje 40 stron, 3 tabele oraz 2 ryciny ilustrujące wybrane treści. Koncentruje się na dwóch głównych zagadnieniach związanych z: (1) epidemiologią, diagnostyką oraz terapią glejaka oraz (2) wykorzystaniem nanomateriałów w terapiach antynowotworowych. Na wstępie Doktorant przedstawia zaktualizowaną listę cech nowotworów wg. Hanahana, a następnie koncentruje się na szczegółowym opisie jednej z nich – aktywacji inwazji komórkowej i mechanizmów przerzutowania. W tym kontekście charakteryzuje również macierz zewnątrzkomórkową poczynając od budowy, składu jakościowego i ilościowego oraz regulacji jej składu w komórkach zdrowych oraz nowotworowych. Doktorant wskazuje na istotną rolę metaloproteinaz (MMP-2 oraz MMP-9) w migracji komórek nowotworowych. Stężenie tych enzymów w macierzy zewnątrzkomórkowej rośnie wraz z progresją nowotworu, co umożliwia komórkom glejaka uwalnianie się z niszy nowotworowej. W tej części na szczególną uwagę zasługuje podrozdział dotyczący badań mechanobiologicznych nowotworów z użyciem mikroskopii sił atomowych zilustrowany dwiema rycinami. Możliwość obrazowania przyżyciowego komórek jest istotnym osiągnięciem w dziedzinie oceny potencjału rozwojowego, agresywności oraz chemiooporności nowotworów. Wysoka heterogenność



sztynności w obrębie nowotworów, nieobserwowana w zdrowej tkance mózgowej, daje nadzieję na opracowanie nowego, skutecznego parametru wykorzystywanego w diagnostyce nowotworów.

W przypadku glejaka mechanizmem stojącym za zwiększeniem sztywności komórek jest odkładanie się tenascyny C, na skutek zwiększonej ekspresji HIF1a (w tej części pracy ani też w pozostałej, ani również w wykazie skrótów stosowanych w pracy nie znajdujemy wyjaśnienia skrótów HIF1a oraz IDH1, choć białka kryjące się pod ich nazwami wydają się być kluczowe). W rozdziale 1.4.1. Autor pracy wspomina o regulatorze ekspresji tenascyny C (miR-218-5p) i w jednym zdaniu rozdziału *Wprowadzenie*: „Naturalnie występującym bezpośrednim regulatorem ekspresji TN-C jest miR-218-5p, który przyłącza się do 3' regionu mRNA TN-C i prowadzi do degradacji transkryptu.” zamyka jego charakterystykę, pozostawiając niedosyt wiedzy w tej części pracy. W opinii Recenzenta należałoby poświęcić osobny podrozdział wprowadzenia literaturowego charakterystyce cząsteczki miR-218-5p oraz rodziny genów miRNA-218. W dalszej części wprowadzenia teoretycznego Doktorant skupia się na epidemiologii, objawach, diagnostyce obrazowej i molekularnej, czynnikach zwiększających ryzyko, stosowanych metodach oraz perspektywach w terapii glejaka. Studium literaturowe jest wnikliwie, jednakże „wymagające” od czytelnika. Mała liczba rycin czy tabel ilustrujących przynajmniej częściowo zagadnienia teoretyczne sprawia, że wstęp traci na przejrzystości pomimo włożonej, ogromnej pracy oraz rzetelności (do końca rozdziału 1.6.6. Autor przytoczył 201 cytowań, w zdecydowanej większości najnowszych publikacji naukowych!), fachowej terminologii i poprawności językowej. Podrozdział 1.7. *Nanomateriały jako nowe narzędzia przeciwnowotworowe* jest wnikliwym opisem naukowym uwzględniającym definicję nanocząstek, podział oraz poszczególne grupy nanocząstek (węglowe, metaliczne, tlenków metali, polimerowe), zastosowanie nanocząstek w medycynie, a w szczególności w leczeniu nowotworów mózgu. W tej części pracy, szczególnie ważny jest aspekt związany z możliwością opracowania nanocząstek zdolnych do przenikania przez barierę krew-mózg oraz wykorzystania ich w terapii fotodynamicznej. Wstęp literaturowy zwieńcza opis modeli glejaka.

Pomimo drobnych usterek oraz niedociągnięć wskazanych przez Recenzenta nie można w żaden sposób podważyć dużej wartości merytorycznej przeglądu literaturowego zawartego w ocenianej pracy. Stał się on przesłanką do trafnie postawionych trzech głównych celów pracy czyli (1) zbadania właściwości migracyjnych komórek nowotworowych, (2) określenia potencjału terapeutycznego charakteryzowanych w pracy nanocząstek oraz (3) stworzenia i optymalizacji trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka. Autor wskazuje, że cele pracy zostały zrealizowane w oparciu o trzy hipotezy badawcze. W opinii Recenzenta sformułowane w obecny sposób hipotezy badawcze nie wpisują się w powszechne rozumienie hipotezy badawczej jako przypuszczenia czy prawdopodobieństwa wystąpienia lub wyeliminowania określonego zjawiska, wydarzenia, procesu w konkretnym czasie i miejscu. Właściwością hipotezy badawczej jest to, że po przeprowadzeniu badania, może zostać potwierdzona bądź obalona. Czy można zatem dla przykładu potwierdzić lub obalić hipotezę sformułowaną: „Określenie wpływu miR-218 na właściwości migracyjne komórek glejaka”.

Sugeruję zatem przeredagować zdania:

1. *Określenie wpływu miR-218 na właściwości migracyjne komórek glejaka wielopostaciowego.*



2. Ocena cytotoksyczności nanocząstek mogących przenosić terapeutyki przeciwnowotworowe.
3. Budowa nowego trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka przeznaczonego do badania procesów inwazji nowotworowej oraz do oceny efektywności nowych terapeutyków o potencjale antyinwazyjnym.

by brzmiały jak hipotezy badawcze.

Materiały i metody wykorzystane w pracy zawarte zostały w rozdziale 6. i obejmują 14 stron jednostronnego wydruku komputerowego. W podrozdziale 6.2. w tabeli opisującej używane podczas pracy gotowe media hodowlane do kultur komórkowych znajduje się medium GBO z dopiskiem *produkcja własna*. W opinii Recenzenta sformułowanie to nie jest precyzyjne, a medium to nie powinno się znaleźć w ten sposób zatytułowanej tabeli. Nie jest bowiem jasne, czy skład medium GBO został opracowany na podstawie danych literaturowych czy doświadczalnie, na podstawie własnych badań i czy jego skład jest chroniony prawem własności. Po wnikliwszej analizie cytowanej literatury – pozycja [349] - *Jacob F, Salinas RD, Zhang DY, Nguyen PTT, Schnoll JG, Wong SZH, Thokala R, Sheikh S, Saxena D, Prokop S, Liu DA, Qian X, Petrov D, Lucas T, Chen HI, Dorsey JF, Christian KM, Binder ZA, Nasrallah M, Brem S, O'Rourke DM, Ming GL, Song H. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. Cell. 2020 Jan 9;180(1):188-204.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.036. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31883794; PMCID: PMC7556703* – można stwierdzić, że skład medium GBO został prawdopodobnie opracowany na podstawie tej publikacji, co należało wskazać w opisie lub w tabeli.

Tabela w podrozdziale 6.1. jest niepełna. Nie znajdujemy w niej między innymi *Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)* czy zestawów *Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT2 Profiler PCR Array* oraz *Human Cell Motility RT2 Profiler PCR Array*, które zostały użyte podczas analizy wpływu miR-218-5p na ekspresję genów związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową. Brakuje wskazania numeru katalogowego oraz producenta testu MTT. Nie ma również wymienionego pochodzenia użytego miR-218-5p, nie można również znaleźć żadnych informacji o *mimic miRNA* i *SCR siRNA* w dysertacji. Niektóre wyżej wymienione informacje znajdują się w załączniku 1 (publikacja - *miR-218 affects the ECM composition and cell biomechanical properties of glioblastoma cells*), jednakże brak wskazania w dysertacji konkretnego odnośnika do nich, utrudnia czytelnikowi odbiór pracy. Recenzent prosi również Doktoranta o wyjaśnienie sformułowania ze strony 93: *Hodowlę, która nie wytworzyła struktur większych niż 50uM zutilizowano*. Proszę również o doprecyzowanie sformułowania ze strony 95: *Oddzielnie mieszano 250 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium z Lipofectamine™ 2000 oraz 250 µl Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium z odpowiednią ilością krótkiego RNA lub plazmidu*. W rozdziale 6. *Materiały i metody* należałoby również uporządkować i ujednolicić tekst. W tej części pracy na zmianę znajdujemy oznaczenia 24h i 24 h, 24 godziny; 10 µL i 10µl, 10 tysięcy i 10tys., płytka typu 6-well i płytka 6-dołkowa, 37stC i 4°C, czas w min i minutach, prędkości wirowania w jednostkach: g, x g, rpm, rcf itp.

Pomimo uwag Recenzenta dotyczących niedociągnięć pisarskich w rozdziale 6. należy stwierdzić, że od strony merytorycznej i doboru metod do założonych celów rozdział *Materiały i metody* nie budzi zastrzeżeń.



Pragnę też wyrazić słowa uznania dla Doktoranta za znajomość szerokiego wachlarza metod (metody biologiczne, w tym hodowle komórkowe 2D, 3D, cała gama testów toksyczności, metody analizy ekspresji genów na poziomie mRNA; metody fizyko-chemiczne, spektroskopia sił pojedynczej komórki) i umiejętne ich wykorzystanie. Niewątpliwie warsztat metodyczny mgr. Konrada Kuczyńskiego jest poparty wieloletnim doświadczeniem pracowników Zakładu Neuroonkologii Molekularnej Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, Promotora dr. hab. Katarzyny Rolle, prof. IChB PAN oraz Promotora pomocniczego dr. inż. Bartosza Grześkowiaka z Centrum NanoBioMedycznego Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Nie bez znaczenia dla tej części pracy jest również doświadczenie jakie Doktorant zdobył w trakcie stażu realizowanego w *Berlin Institute for Medical Systems Biology, Max Delbrück Center for Molecular Medicine* (BIMSB, MDC) pod okiem dr Agnieszki Rybak-Wolf. Część analiz Doktorant przeprowadził w Zakładzie Badań Mikroukładów Biofizycznych Instytutu Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie, gdzie nabył doświadczenie z zakresu mikroskopii sił atomowych.

Wyniki w pracy zostały zamieszczone na 33 kartach jednostronnego druku, zilustrowane 23 rycinami i 3 tabelami. Wyniki podzielone zostały na następujące zagadnienia: (1) ocena wpływu miR-218-5p na zmiany właściwości mechanicznych komórek glejaka, (2) ocena cytotoxyczości nanocząstek Mag@PEI, (3) ocena wpływu wielkości nanocząstek na ich właściwości cytotoxyczne, (4) nowe modele organoidów pochodzenia glejakowego.

Pierwsza część wyników koncentruje się na opisie wpływu miR-218-5p na: (1) zmiany właściwości mechanicznych komórek glejaka (sztywność, szorstkość, cytoszkielet), (2) ekspresję genów związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową, (3) procesy związane z migracją komórek glejaka. Opis wyników uzyskanych w ramach załączonej do pracy publikacji (załącznik 1) jest wstępem do omówienia wyników, które zostały zrealizowane na potrzeby ocenianej pracy doktorskiej.

W przedstawionej do oceny dysertacji jednym z analizowanych procesów jest ekspresja genów, a precyzyjniej zmiany ekspresji genów. Część wykonanych badań dotyczyła analizy ekspresji genów na poziomie mRNA i/lub białek. W opinii Recenzenta tytuł podrozdziału 3.1.1. *Analiza wpływu miR-218-5p na ekspresję białek związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową* jest nieprecyzyjny w zakresie użytego określenia ekspresja białek, zwłaszcza że później Autor jednak konsekwentnie wskazuje na analizę transkryptów oraz ekspresję genów.

Doktorant przeanalizował zmianę ekspresji 168 genów pod dodaniem miR-218-5p (suplementacja w opinii Recenzenta jest niezbyt fortunną kalką językową). Z 47 genów ulegających deregulacji pod wpływem miR-218-5p, Autor pracy skomentował szerzej wyłącznie zmianę dotyczącą tenascyny C. Jeśli zatem celem było wyłącznie wskazanie różnic dotyczących tenascyny C, to należało przeprowadzić badanie wyłącznie dla tenascyny C. Jeśli jednak celem była analiza wpływu miR-218-5p na ekspresję genów innych białek związanych z migracją, adhezją oraz macierzą zewnątrzkomórkową, to komentarz do wyników przeprowadzonych i opisanych w tym rozdziale badań jest bardzo oszczędny, a potencjał wyników niewykorzystany. Ponadto proszę o wyjaśnienie: (1) dlaczego do analizy ekspresji genów dobrano stężenie 50 nM cząsteczki miR-218-5p,



podczas gdy do badania adhezji, sztywności oraz szorstkości komórek wykorzystano stężenia 10 i 50 nM, (2) dlatego w załączonej do pracy publikacji wskazuje się na 160 przeanalizowanych genów a w dysertacji na 168.

Odnosnik w podrozdziale 6.5.5. *Real time PCR* dotyczący profilu ekspresji genów (tabela 6) jest niewłaściwy. Należałoby również wskazać w wynikach nazwę analizowanej linii komórkowej, tak jak zrobiono to w rozdziale 3.1.2.

Rozdział 3.2. opisuje wyniki uzyskane na podstawie badań cyto-, geno-, mitotoksyczności oraz toksyczności zależnej od aktywnych form tlenu dla nanocząstek Mag@PEI. Proszę o wyjaśnienie czy użyte w tej części pracy sformułowanie *toksyczność ogólna* odnosi się do omawianej cytotoksyczności. Doktorant przeprowadził testy cytotoksyczności (MTT, LDH), test genotoksyczności oraz mitotoksyczności dla komórek glejaka U-118-MG oraz komórek kontrolnych MRC-5 stosując komercyjnie dostępne zestawy. Oceny poziomu stresu oksydacyjnego w/w komórek przeprowadzono metodami fizyko-chemicznymi poprzez pomiar: (1) ilości H₂O₂, (2) aktywności enzymatycznej katalazy, (3) aktywności enzymatycznej peroksydazy glutationowej. Przebadano również poziom ekspresji genów kodujących katalazę oraz peroksydazę glutationową na poziomie mRNA. Ze względu na to, że w rozdziale *Materiały i metody* napisano: *Podczas analizowania paneli genów dostępnych w zestawach Extracellular Matrix & Adhesion Molecules RT2 Profiler PCR Array oraz Human Cell Motility RT2 Profiler PCR Array stosowano się do protokołu dołączonego przez producenta a dane analizowano z wykorzystaniem platformy online do analizy wyników* Recenzent wnioskuje, że wcześniejszy akapit dotyczy analizy ekspresji genów katalazy oraz peroksydazy glutationowej. Proszę zatem o wyjaśnienie dotyczące doboru genu referencyjnego w powyższej analizie oraz wskazanie gdzie umieszczono sekwencje starterów użytych do analizy.

Zdanie ze strony 57: *Wykazany w poprzednich badaniach brak zmian na poziomie ekspresji genów katalazy i peroksydazy glutationowej (Ryc. 11) nie jest wystarczającym dowodem na brak aktywności enzymów* w opinii Recenzenta powinno brzmieć: *Wykazany w poprzednich badaniach brak zmian na poziomie ekspresji genów katalazy i peroksydazy glutationowej (Ryc. 11) nie jest wystarczającym dowodem na brak zmian aktywności enzymów*.

Część wyników dotycząca badania wpływu wielkości nanocząstek na ich właściwości toksyczne powstała na podstawie przeprowadzonych doświadczeń z zastosowaniem czterech linii komórkowych człowieka, jednoskładnikowych cząstek polimerowych wykonanych z polidopaminy o rozmiarach 100 nm, 140 nm, 240 nm. W rozdziale 3.3.1. *Charakterystyka nanomateriału* znajdujemy stwierdzenie, że *nanocząstki PDA zostały zsyntetyzowane przez naszych partnerów w NanoBioMedycznym UAM w Poznaniu z użyciem zmodyfikowanego protokołu opublikowanego w 2021 roku [355]*, czy Autor miał na myśli wyłącznie syntezę czy również charakterystykę? Wyniki uzyskane w dwóch testach, w dwóch niezależnych analizach (test MTT i LDH) znacząco się od siebie różniły w związku z tym proszę Doktoranta o szerszy komentarz tej części wyników.



W opinii Recenzenta wyjątkowo aplikacyjny charakter ma część badań dotycząca stworzenia nowego modelu 3D komórkowego glejaka. Modele 2D, pomimo zalet związanych między innymi z względną łatwością hodowli, nie są dobrymi modelami nowotworów, które naturalnie mogą tworzyć niejednorodne trójwymiarowe struktury przestrzenne, niejednokrotnie unaczynione. Odwzorowanie w warunkach laboratoryjnych przestrzennych struktur modeli glejaka uwiarygadnia wyniki z w ten sposób uzyskanych analiz. Doktorant postawił sobie ambitny cel zbudowania i zoptymalizowania hodowli nowego hybrydowego modelu badawczego – *assembloïdu*, organoidu o strukturze zdrowego mózgu (HBO) oraz organoidu pochodzącego od komórek glejaka (GBO). Przeprowadzone badania wykazały duże różnice w budowie wewnętrznej obu części *assembloïdu*, jednakże nie udało się zaobserwować różnicowej ekspresji tenascyny C. Z punktu widzenia aplikacyjnego, za najważniejsze w pracy doktorskiej uważam stworzenie hybrydowego modelu badawczego organoidu o strukturze zdrowego mózgu w połączeniu z organoidem pochodzącym od komórek glejaka. Jest oczywiste, że model ten wymaga dalszego testowania, jednakże w opinii Recenzenta struktura taka zdecydowanie lepiej będzie odwzorowywać zachodzące w naturze mechanizmy związane z procesami inwazji nowotworowej oraz leczenia.

Dyskusja jest bardzo szeroka i została podzielona na podrozdziały będące odnośnikami do uzyskanych wyników, co niewątpliwie ją porządkuje i świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. W dyskusji, Pan mgr inż. Konrad Kuczyński umiejętnie konfrontuje wyniki swojej pracy z wynikami dostępnymi w światowej literaturze. Rozprawę doktorską kończą cztery poprawnie sformułowane wnioski, które są w części odpowiedziami na wcześniej sformułowane problemy badawcze: określenie wpływu miR218 na właściwości migracyjne komórek glejaka oraz ocena cytotoksyczności nanocząstek Mag@PEI oraz nanocząstek PDA. Kierowany dużą ostrożnością naukową, prawdopodobnie ze względu na wyniki uzyskane w pracy, Doktorant nie zdecydował się na sformułowanie wniosków dotyczących zagadnienia związanego z budową nowego trójwymiarowego modelu komórkowego glejaka. Swoją komentarz do tej części pracy ujął jednak w rozdziale 4.4. *Nowe modele w badaniu inwazji glejaka* będącym częścią dyskusji.

Wniosek końcowy:

Reasumując należy uznać, że praca doktorska Pana mgr. inż. Konrada Kuczyńskiego jest pracą naukową o charakterze zarówno poznawczym jak i aplikacyjnym. Praca została zredagowana i napisana w poprawnej formie, zgodnie z kanonami obowiązującymi przy pisaniu tego rodzaju opracowań. Odnosząc się do zakresu przedstawionych informacji należy uznać, że Doktorant posiada dużą wiedzę w zakresie badanej tematyki. Posiada również umiejętność prawidłowego doboru i wykorzystania warsztatu badawczego. Wskazane w recenzji uchybienia są przede wszystkim sugestiami mającymi podnieść wartość opracowania i zwiększyć jakość prezentowanych wyników w przyszłości.

Mając na uwadze wysoką jakość badań, dojrzałość naukową Doktoranta, potencjał aplikacyjny i użyteczność przedstawionych wyników rozprawy doktorskiej nie ma wątpliwości, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr. Konrada Kuczyńskiego pod tytułem *Wykorzystanie nanotechnologii w badaniach właściwości*



biologicznych i biomechanicznych komórek nowotworowych spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższymi nauce (Dz.U z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), Ustawie z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższymi nauce (Dz.U z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz Sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (uchwała Rady Naukowej ICHB PAN nr 99/2022/Internet z dnia 9 czerwca 2022 r.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Wniosek o wyróżnienie:

W przedstawionej do oceny dysertacji szczególną uwagę zwraca pierwszoplanowa rola Doktoranta w powstanie wyników badań. Podjęta w rozprawie tematyka jest trudna i wymagająca dla badacza zarówno pod względem koncepcyjnym oraz doświadczalnym. Znajomość szerokiego wachlarza metod i umiejętne ich wykorzystanie w pracy świadczą o dojrzałości badawczej Doktoranta. Praca doktorska ma charakter aplikacyjny, co jest bardzo ważne z punktu widzenia możliwości wykorzystania wyników w praktyce. Wiedza Doktoranta z zakresu podejmowanej w pracy tematyki jest rozległa i ugruntowana, o czym świadczy sposób i jakość podawanych i opisywanych informacji.

Mając na uwadze wysoką ocenę całościową rozprawy oraz nową dla nauki wiedzę o dużym użytecznym potencjale - zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Konrada Kuczyńskiego.