



UNIwersYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



dr hab. Barbara Wagner, prof. UW  
Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
Pasteura 1  
02-093 Warszawa

Warszawa, 21.09.2023 r.

### Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Kupiec

---

pod tytułem: "Badanie przemian *in vitro* cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas"

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Moniki Kupiec: "*Badanie przemian in vitro cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas*" powstała w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej pod opieką naukową promotora dr hab. inż. Katarzyny Pawlak. Promotorem pomocniczym była dr hab. inż. Magdalena Matczuk. Praca została wykonana w ramach projektu „*Opracowanie metod badania zaburzeń równowagi jonomicznej i ich genezy w komórkach rakowych poddawanych działaniu cytostatyków*” finansowanego przez NCN (nr grantu 2013/09/B/ST4/009).

**Cel pracy:** obejmował zbadanie, w warunkach naśladujących warunki fizjologiczne, przemian kompleksów złota (I/III) oraz kompleksu rutenu (III) pod kątem ich potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych. Obserwacjami objęte zostały procesy interakcji z glutationem oraz składnikami surowicy krwi i cytozolu komórkowego, a punktem wyjścia dla opisanych działań eksperymentalnych było sformułowanie następujących hipotez:

- cytotoksyczne kompleksy metali działają jak proleki, ulegając aktywacji przez hydrolizę lub redukcję,
- pochodne badanych kompleksów wchodzi w interakcje z białkami transportującymi we krwi,
- badane kompleksy i ich pochodne wpływają na skład komórkowy prowadząc do apoptozy komórkowej.

**Struktura recenzowanej pracy doktorskiej** zachowuje tradycyjny układ pracy pisemnej z podziałem na część teoretyczną, stanowiącą wprowadzenie do poruszanych zagadnień oraz część eksperymentalną, w której znajduje się opis przeprowadzonych badań własnych.

Praca posiada logiczną strukturę. Wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim znajdują się odpowiednio na stronach: 5-7 oraz 8-10, kolejne strony pracy zajmuje spis treści (str. 11-13). Bardzo pomocne dla dalszej lektury jest umieszczenie na stronach 14-15 wykazu skrótów stosowanych w dysertacji. Prawidłowo sformułowany cel pracy Autorka zaprezentowała na str. 16, a ponieważ wyniki przeprowadzonych badań zostały już częściowo opublikowane, to lista opublikowanych prac zajmuje kolejne dwie strony (str. 17 i 18). Część literaturowa (str. 19-59) składa się z 5 rozdziałów, opis badań własnych znajduje się w części doświadczalnej (str. 60-159), również składającej się z 5 rozdziałów. Bibliografia (str. 160-173) obejmuje 165 aktualnych pozycji literaturowych o zaskakującym (dla mnie) formatowaniu, które nie odpowiada żadnemu formatowi dostępnemu w powszechnie używanym systemie zarządzania literaturą: Mendeleyu. Ten sam styl cytowania jest stosowany konsekwentnie dla całej bibliografii i dla listy artykułów własnych, ujętych w spisie na str. 17 i 18.

W pracy znajduje się 26 tabel i 64 ilustracji. Materiał rysunkowy jest bardzo starannie opracowany pod względem estetycznym, mam jedynie uwagi dotyczące czytelności niektórych wykresów zamieszczonych w wydrukowanej wersji pracy doktorskiej. Uważam, że wszystkie ilustracje było można poddać edycji w taki sposób, aby (znając zalecany, oficjalny format wydruku), udało się zachować czytelność opisu osi wykresów lub wyjaśnień słownych wbudowanych w schematy i rysunki (np.: Rys.23 na str.53, Rys.27 na str.59, Rys.31 na str.77, Rys.56 na str.134, Rys.62 na str.150). Jednocześnie zdaję sobie sprawę z tego, że czytelność wspomnianych wykresów jest bez zarzutu w wersji elektronicznej pozwalającej na, dowolne niemal, powiększenie napisów i rozróżnienie poszczególnych symboli umieszczonych w opisach.

**Ocena formalno-naukowa rozprawy:** Praca dotyczy bardzo aktualnej tematyki badawczej z obszaru międzydziedzinowych aktywności naukowych, odwołujących się do doświadczeń i wiedzy z zakresu nauk medycznych oraz nauk chemicznych. W dobie starzejącego się społeczeństwa i niepokojąco rosnących statystyk zapadalności na choroby nowotworowe, bez najmniejszego zawahania uznaję wysoką atrakcyjność naukową tematyki recenzowanej rozprawy o badaniach nad nowymi związkami o potencjalnie leczniczym działaniu.

Moim zdaniem, sprawne poruszanie się po zagadnieniach naukowych, których celem miało być poznanie mechanizmu transportu wybranych kompleksów metali oraz identyfikacja kluczowych czynników wpływających na ich działanie wewnątrz komórek, było nie lada wyzwaniem. Z tego powodu, jednym z kluczowych elementów udanej pracy było umiejętne napisanie wstępu teoretycznego, który pozwolił w wyważony sposób na zaprezentowanie ogólnej wiedzy literaturowej dotyczącej tematyki objętej zakresem recenzowanej pracy doktorskiej. Wprawdzie w części eksperymentalnej Doktorantka skupiła się na działaniach z obszaru chemii analitycznej ale, zgodnie

z oczekiwaniami, we wprowadzeniu opisała także podstawowe zagadnienia farmakologiczne i przedstawiła najbardziej popularne sposoby leczenia chorób nowotworowych wraz z krótką charakterystyką skutków ubocznych, jakie mogą wystąpić. W pierwszych rozdziałach poświęconych wykorzystaniu metaloleków w leczeniu nowotworów znajduje się opis kompleksów platyny, rutenu i złota, ich farmakologii oraz badań poświęconych farmakokinetyce i farmakodynamice wybranych związków.

Chemia instrumentalna zaprezentowana jest w kolejnych rozdziałach, z których każdy poświęcony został jednej z technik analitycznych. Wybór opisanych technik instrumentalnych jest podyktowany ich późniejszym wprowadzeniem do zrealizowanego przez Doktorantkę programu analitycznego. Wśród metod badawczych stosowanych w badaniach pojawiła się chromatografia cieczowa (LC), chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz (RLC), chromatografia wykluczania (SEC), elektroforeza kapilarna (EC) oraz sprzężone układy z detekcją mas: spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS) i spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS). Na dalszych stronach znajduje się opis proteomicznych strategii badania białek z użyciem spektrometrii mas i jako nieoczywisty dla mnie, aczkolwiek bardzo inspirujący, wybór voltamperometrii sprzężonej ze spektrometrią mas. Autorka zarysowała we wstępie także potencjał zastosowania w badaniach farmakologicznych elektrochemicznej komory reakcyjnej (ECR).

Ostatni rozdział części teoretycznej dotyczy opracowania i wizualizacji wyników. Ta część pokazuje możliwości wprowadzenia do badań działań systematyzujących osiągnięcia analityczne, pozwalających na redukcję danych i zaprezentowanie ich w postaci graficznej, jak najbardziej czytelnej dla szerokiego grona osób zainteresowanych omawianymi badaniami. W dzisiejszych czasach opracowanie danych chyba jednak stosunkowo trudno uznać jedynie za działania współtowarzyszące aktywności laboratoryjnej. Tymczasem rozdział poświęcony analizie i wizualizacji danych doświadczalnych (str.58-59) zajmuje niecałe 2 strony: jedna strona opisu i druga strona, na której widać przykładowe wykresy. Wskazana ilustracja (Rys.27, str.56) przedstawia rozkład danych uzyskanych w ramach analizy głównych składowych oraz mapę cieplną zmian zawartości fragmentów genów w komórkach piersi i gruczołu krokowego na podstawie odnośnika [137]. Moim zdaniem tak skromny opis chemometrycznego podejścia do opracowania wyników pod względem statystycznym oraz graficznym zdecydowanie zasługuje na rozwinięcie i komentarz podczas obrony w kontekście opracowania i wizualizacji danych wykorzystanych przez Doktorantkę w jej badaniach. Wartość merytoryczną pracy eksperymentalnej mogę ocenić przede wszystkim od strony analitycznej. Z tego powodu chciałabym zaznaczyć, że zaproponowany przez mgr inż. Monikę Kupiec scenariusz badawczy, skonstruowany wokół sekwencyjnego zaangażowania atomowej i cząsteczkowej spektrometrii mas w układach sprzężonych z technikami rozdzielania, lub z technikami elektrochemicznymi oceniam bardzo pozytywnie. Wysoko oceniam całą koncepcję wieloetapowego procesu analitycznego wykorzystującego możliwości nowoczesnych narzędzi instrumentalnych (ESI-MS/MS, SEC-ICP-MS, CE-ESI-MS/MS, ECR-ESI-MS) oraz zalety

elektrochemicznej komory reakcyjnej (ECR), która pozwoliła na prześledzenie przemian kompleksów złota i rutenu.

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy coraz bardziej docenianego w chemii analitycznej podejścia metodologicznego, polegającego na komponowaniu szczegółowych, wysokospecjalistycznych i zindywidualizowanych scenariuszy badawczych ukierunkowanych na rozwiązywanie konkretnych problemów naukowych. Pani mgr inż. Monika Kupiec właśnie takie podejście zaproponowała dla wieloetapowych badań wybranych kompleksów złota i rutenu, o potencjalnych właściwościach przeciw-nowotworowych. Do badań Doktorantka wybrała linie komórkowe z banku Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych (ATCC):

- a. ludzkie komórki raka płuc (A-549),
- b. ludzkie prawidłowe komórki płuc (MRC-5),
- c. ludzkie komórki raka jelita grubego (HT-29).

Poza opisem roli MRC-5, w pracy nie znalazłam wyjaśnienia jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka podczas doboru akurat tych linii komórkowych?

**Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna:** Praca jest poprawna pod względem formalno-językowym. Autorka zastosowała środki językowe zgodne z obowiązującymi normami znaczeniowymi, jednak moim zdaniem nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć stylistycznych i interpunkcyjnych.

Na str. 19 w zdaniu „*Dlatego poszukuje się nowych, skutecznych i bezpiecznych leków na bazie różnych metali*[4].” Zabrakło spacji pomiędzy słowem „*metali*” i kwadratowym nawiasem cytowania odnośnika nr 4.

Nie jestem pewna poprawnej konstrukcji zdania znajdującego się na tej samej str.19: „*W efekcie, wiele kompleksów wykazuje odmienną aktywność cytotoksyczną o zróżnicowanej selektywności [5], które mogą zmniejszać skutki uboczne i prawdopodobieństwo występowania lekooporności [6, 7].*” Czy dobrze zrozumiałam, że: „*W efekcie, wiele kompleksów wykazuje odmienną aktywność cytotoksyczną o zróżnicowanej selektywności [5], która może zmniejszać skutki uboczne i prawdopodobieństwo występowania lekooporności [6, 7]*”?

Na str. 23 znajduje się kolejne zdanie: „*Spośród wszystkich przebadanych kompleksów platyny, karboplatyna, oksaliplatyna, nedaplatyna, heptaplatyna i lobaplatyna (Rysunek 1) uzyskały aprobatę kliniczną, z których pierwsze dwa są stosowane na całym świecie, podczas gdy trzy ostatnie są stosowane głównie w Azji*”, które chyba powinno brzmieć następująco: „*Spośród wszystkich przebadanych kompleksów platyny, karboplatyna, oksaliplatyna, nedaplatyna, heptaplatyna i lobaplatyna (Rysunek 1) uzyskały aprobatę kliniczną. Pierwsze dwa związki są stosowane na całym świecie, podczas gdy trzy ostatnie są stosowane głównie w Azji*”.

Bardzo długie zdanie ze str.35: „Badania prowadzą do opracowania modeli opisujących transport i metabolizm leku w organizmie zależny od jego struktury i parametrów fizykochemicznych, co pomaga projektować nowe leki o zdefiniowanych właściwościach [94, 95] i uniknąć niepożądanych efektów np. substancja szybko ulegająca przemianie może utworzyć formę aktywną już w przelyku i doprowadzić do niepożądanych efektów ubocznych, zbyt duża rozpuszczalność związku w wodzie ogranicza wydajność transportu przez membranę, a zbyt duża wydajność tworzenia trwałych adduktów białko-lek wymaga zwiększania dawki początkowej [96]” proponowałabym podzielić na choćby dwa krótsze.

Znalazłam pewną niekonsekwencję w nazewnictwie widm uzyskanych w efekcie pomiarów z detekcją mas: 14 razy pojawia się nazwa „widmo mas”, ale także 2 razy występuje zamiennie nazwa „widmo masowe”. Proszę wyjaśnić czy można je stosować wymiennie, a jeśli nie powinno się tego robić, to które z nich powinno być stosowane?

W takiej edycji tekstu zawsze pozostają niezauważone zmiany, które nie należą już do poprawnej pierwotnej wersji tekstu, a częściowo jedynie zostały zamienione nową wersją zdania. Takie miejsce znajduje się na str.50 w zdaniu: „Badane jest w sten sposób powinowactwo metaloleku do białek i związków małocząsteczkowych krwi czy cytozolu komórkowego, a tym samym do opisu szlaku metabolicznego [94].”

Wydaje mi się, że na str.64 pozostał jeden ślad codziennego żargonu laboratoryjnego w postaci odmiany nazwy bufora Tris w zdaniu: „Roztwory albuminy z kompleksem metalu przygotowano poprzez rozpuszczenie 30 mg albuminy w 1,35 mL roztworu 30 mM Trisu

Na str. 72 w pkt 2 w zadaniu: „Zakładano, że pik ten pochodził od kompleksu metalu” brakuje spacji między słowami „zakładano,” i „że”.

Na str.149 pojawiła się nadmiarowa spacja, która rozdzieliła słowo „filamenty” w zdaniu: „...keratyny (K1C18 i K2C8) mogą tworzyć fi lamenty wzmacniające komórki nabłonkowe i chroniące przed stresem oksydacyjnym i śmiercią komórek [160, 161]...”

W podpisie rysunku 64 na str.154 brakuje litery (B) w opisie elektroferogramów:

Rysunek 64. Elektroferogramy CE-ESI(+)-MS (TIC wybranych jonów) peptydów trypsynowych uzyskanych dla cytozolu komórek MRC-5 (czerwona linia) i A-549 (niebieska linia) poddanych działaniu auranofiny **(A)**:

widmo mas ESI-MS dla pików elektroforetycznego o czasie migracji 7,2 min (komórki MRC-5)

#### **Zagadnienia do dyskusji:**

Wyjaśnienie dookreślające w jednej z komórek Tabeli 2 na str.39 podstawowe cechy charakterystyczne techniki LA-ICP-MS brzmi następująco: „Poprawa rozdzielczości obrazu wymaga

zmniejszenia powierzchni próbki pogarszając czułość, kłopoty z normalizacją sygnału". Poproszę o wyjaśnienie tych informacji w kontekście ewentualnego dopasowania tej techniki instrumentalnej do zaproponowanego w pracy scenariusza analitycznego.

Na str.45 Doktorantka przytacza znaczenie metod jonizacji „miękkiej” i „twardej”, z którym nie mogę się do końca zgodzić, biorąc pod uwagę procesy zachodzące podczas jonizacji w plazmie ICP. Poproszę o przedyskutowanie powyżej wspomnianego podziału na jonizację miękką i twardą w kontekście możliwości uzyskania informacji cząsteczkowych i pierwiastkowych (lub izotopowych) w spektrometrii mas.

Jakie były kryteria oceny zmian opisanych na str.74: w rozdziale 4.1.3, czy Doktorantka stosowała jakieś narzędzie oceny statystycznej zarejestrowanych sygnałów?

*„Uzyskane w ten sposób widma nadal zawierały dużo sygnałów, które mogły pochodzić od niespecyficznym interakcji kompleksów ze składnikami próbki lub elementami aparatu, dlatego do określenia tożsamości (fragmentacji) powstałych produktów wybierano tylko sygnały, których natężenie zmieniało się w czasie i/lub które występowały na widmach uzyskanych dla obu rodzajów rozpuszczalników.”*

Proszę wyjaśnić co się kryje pod opisowym stwierdzeniem ze str.74 rozdziału 4.1.3.1 mówiącym, że *„Identyfikacja związków powstałych z auranofiny (Rysunek 30) była dość złożona (...)”*

**Podsumowanie:** Czytając rozprawę doktorską mgr inż. Moniki Kupiec nie znajduję nieścisłości w założeniach naukowych oraz sposobie planowania eksperymentów. Uważam, że do najważniejszych wniosków pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Kupiec można zaliczyć wyraźne wskazanie konieczności prowadzenia badań nad aktywacją kompleksów metali za pomocą różnych technik w celu weryfikacji proponowanych mechanizmów reakcji. W swojej pracy Doktorantka jednoznacznie pokazała zalety stosowania różnych technik sprzężonych. Zaangażowanie do badań układu ECR-ESI-MS pozwoliło jej wskazać redukcję Au(III) do Au(I) i Ru(III) do Ru(II) jako potencjalny mechanizm aktywacji kompleksu w organizmie człowieka. W przypadku kompleksu rutenu było to znaczącym osiągnięciem Doktorantki, gdyż taki mechanizm postulowano już od pewnego czasu i brakowało jedynie dowodów na potwierdzenie tej hipotezy. Doktorantka pracowała z roztworami odtwarzającymi warunki fizjologiczne krwi lub cytozolu komórkowego, omijając etap wydzielania i wzbogacania poszukiwanych związków i redukując w ten sposób ryzyko niechcianych zmian.

Pracochłonność prowadzenia pomiarów z zastosowaniem wysublimowanych technik sprzężonych wzbudza moje uznanie, a wysoka wartość merytoryczna opisanych badań została już pozytywnie zweryfikowana przez recenzentów publikacji, w których prezentowane były wyniki włączone do rozprawy. Dotychczasowy dorobek publikacyjny obejmuje artykuły, które bezpośrednio są powiązane z tematem dysertacji doktorskiej i jedną pracą, opublikowaną wprawdzie podczas wykonywania doktoratu, ale pozostającą poza głównym nurtem zainteresowań Doktorantki. Badania

stanowiące treść recenzowanej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w 4 oryginalnych artykułach, które ukazały się w latach 2015-2022 w prestiżowych czasopismach międzynarodowych (IF=3,9-4,6) znajdujących się na liście wysoko punktowanych czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (100-140 pkt. MNiSW). Pani mgr inż. Monika Kupiec jest pierwszym autorem dwóch, spośród czterech wspomnianych prac.

W wykazie wybranych prac Doktorantki znalazły się także 2 rozdziały poświęcone badaniom potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych kompleksów złota. Rozdziały te weszły w skład monografii naukowych, które ukazały się drukiem w 2015 i 2020 roku.

Wyniki prowadzonych badań stanowiły również temat 16 komunikatów ustnych oraz 19 plakatów prezentowanych podczas 13 konferencji krajowych i 22 konferencji międzynarodowych, co świadczy o wysokiej aktywności naukowej mgr inż. Moniki Kupiec w czasie realizacji doktoratu. Dwa komunikaty konferencyjne zostały wyróżnione nagrodami naukowymi.

#### **Ocena końcowa:**

Niniejszym stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Kupiec pt. „*Badanie przemian in vitro cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas*” spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Moniki Kupiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytorycznym recenzowanej pracy, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr inż. Moniki Kupiec. Stosowne uzasadnienie dołączam w odrębnym dokumencie.

21 września 2023 r.

data sporządzenia recenzji

.....  
  
podpis recenzenta

dr hab. Barbara Wagner, prof. UW