



WYDZIAŁ CHEMII

dr hab. Remigiusz Bąchor
Zespół Inżynierii Peptydów
ul. F. Joliot-Curie 14,
50-383 Wrocław
✉ remigiusz.bachor@uwr.edu.pl
☎ chem.uwr.edu.pl ☎ 713757212

Wrocław, 4 września 2023 r.

Rada Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechnika Warszawska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Kupiec pt.: „Badania przemian *in vitro* cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyny Pawlak, prof. PW, oraz promotor pomocniczej dr hab. inż. Magdaleny Matczuk.

Nieustanny i szybki rozwój spektrometrii mas w ostatnich latach sprawił, że stała się ona jedną z najczęściej stosowanych metod analitycznych w badaniach zarówno związków drobnocząsteczkowych jak i złożonych układów molekularnych. Wysoka czułość i rozdzielczość pomiaru a także możliwość stosowania miękkich metod jonizacji, w tym elektrorozproszczenia (ang. *electrospray ionization*, ESI) i wspomaganej matrycą desorpcji i jonizacji laserem (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI), znacznie poszerza spektrum użyteczności tej metody w badaniach. Dlatego też w ostatnich latach obserwuje się zwiększone zastosowanie tej techniki analitycznej w diagnostyce laboratoryjnej i analizach biomedycznych z uwagi na szybkość oznaczeń i ich jednoznaczność. Kompleksy metali przejściowych wykazujące aktywność cytostatyczną stanowią niezwykle ważną i w ostatnich latach intensywnie rozwijaną grupę związków chemicznych o znacznym wpływie na współczesną medycynę. Prowadzone w tym kierunku badania, usytuowane pomiędzy chemią, biochemią i fizyką umożliwiają poszukiwanie nowych, bardziej trwałych układów pełniących rolę potencjalnych leków, czy też analizę ich przemian farmakokinetycznych, co w następstwie może doprowadzić do



zaprojektowania nowych układów o zoptymalizowanych właściwościach. W tę tematykę wpisuje się rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Kupiec.

Przedłożona do recenzji praca doktorska przygotowana została w języku polskim i liczy 173 strony, podzielona została na sześć głównych rozdziałów (Wykaz stosowanych skrótów, Cel pracy, Wykaz opublikowanych artykułów dotyczących tematyki rozprawy doktorskiej, Część literaturowa, Część doświadczalna, Bibliografia), z których Część literaturowa i Część doświadczalna zawierają liczne i poprawnie sformułowane podrozdziały. Układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań i nie budzi moich zastrzeżeń. Treść recenzowanej pracy odpowiada tematowi określone w jej tytule. Podjęta przez mgr inż. Monikę Kupiec tematyka badawcza obejmowała analizę przemian wybranych kompleksów złota(I/III) oraz rutenu(III) w warunkach imitujących środowisko fizjologiczne a także ich oddziaływań ze składnikami serum krwi i cytozolu komórkowego za pomocą różnych technik spektrometrii mas, spektrometrii mas sprzężonej z technikami rozdziału a także strategii proteomicznych. Biorąc pod uwagę ilość przedstawionego w pracy materiału eksperymentalnego zebranego przez Doktorantkę, zwięzłość i w większości klarowność zaprezentowanych danych zasługuje na podkreślenie. Autorka umiejętnie wprowadza czytelnika w tematykę podjętych badań poprzez dobrze przygotowany wstęp teoretyczny opisany na 40 stronach. W rozdziale tym Pani mgr inż. Monika Kupiec przedstawia informacje dotyczące zastosowania metaloleków w leczeniu nowotworów, zawiera informacje dotyczące farmakokinetyki i farmakodynamiki kompleksów metali a także w bardzo dobry sposób przybliży tematykę technik analitycznych stosowanych w badaniach tych związków. Cały ten opis ściśle wiąże się z podjętą przez Doktorantkę tematyką badań i przedstawia wysoki poziom jej wiedzy. Fragment ten napisany jest poprawnym językiem naukowym i wzbogacony licznymi ilustracjami. Znaleźć można tutaj drobne błędy związane z brakiem konsekwencji stosowania kursywy przy określeniu izomerów *cis/trans*, brakuje wyjaśnienia skrótu HMGCR ze strony 29 w wykazie skrótów, pojawiają się drobne błędy językowe (literówki), które nie wpływają na ocenę pracy. Na uwagę zasługuje bardzo przydatne i dobrze wykonane zestawienie najczęściej stosowanych technik analitycznych w badaniach farmakologicznych kompleksów metali przedstawione w tabeli 2 (strony 38-39). Ilość zgromadzonego materiału w tej części oraz umiejętność posługiwania się literaturą naukową a przede wszystkim jej wyszukiwaniem i odpowiednim doбором świadczą w mojej opinii o dużej dojrzałości naukowej Autorki recenzowanej pracy prezentując jednocześnie wysoką wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora. W rozdziale „Część doświadczalna” Autorka przedstawiła zarówno procedury postępowania analitycznego jak i opis stosowanej aparatury czy odczynników chemicznych, część obejmującą



wyniki i dyskusję oraz podsumowanie. Fragment ten liczy 96 stron. Rozpoczyna go opis stosowanej aparatury, który w tej części jest zwięzły gdyż opis parametrów aparatury w przypadku konkretnych analiz Autorka zaprezentował w dalszej części pracy przy przedstawianiu konkretnych wyników badań, co ułatwia poruszanie się po tekście. Autorka przedstawiła także procedury przygotowania cytozolu komórkowego do badań czy też roztworów do analiz metodami spektrometrii mas. Pracę kończy bibliografia licząca 165 pozycji literaturowych odnoszących się w większości do publikacji naukowych przedstawionych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, jak również do stron internetowych czy książek.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Moniki Kupiec porusza bardzo aktualną i niezwykle ważną z punktu widzenia naukowego tematykę obejmującą zastosowanie spektrometrii mas w analizie przemian cytotatycznych kompleksów wybranych metali przejściowych w warunkach imitujących środowisko fizjologiczne a także ich oddziaływań ze składnikami serum krwi i cytozolu komórkowego. W realizacji celu pracy Autorka posłużyła się licznymi metodami fizykochemicznej analizy złożonych mieszanin, takimi jak, chromatografia wykluczania sprzężona z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, technikami ESI-MS oraz ESI-MS/MS, metodą CE-ESI-MS/MS a także techniką ECR-ESI-MS do monitorowania przemian analizowanych związków czy też ich wpływu na zmiany w obrębie proteomu komórkowego. Opis wyników i dyskusji (podrozdział 4, strona 68) Pani mgr inż. Kupiec rozpoczyna od przedstawienia badań kinetyki hydrolizy kompleksów złota metodą SEC-ICP-MS/MS i ESI-MS/MS, podając w tabeli 5 optymalne parametry aparatury dla wymienionych metod (parametry źródła jonów, faza ruchoma, warunki jonizacji i analizy). Ponieważ Autorka nie tłumaczy wyboru wskazanych parametrów w tekście, tutaj nasuwa się pytanie, w jaki sposób były zostały one zoptymalizowane i które z nich wymagały największej modyfikacji w celu przeprowadzenia jednoznacznej analizy? Pomimo tej niejasności, Autorka poprawnie przedstawia wyniki i wnioski płynące z przeprowadzonej analizy. Zdarza się jednak, że w tekście brakuje odwołania do uzyskanych wyników po opisie wskazującym jednoznacznie na interpretację danych eksperymentalnych. Tak jest między innymi na stronie 74 w pierwszym akapicie tekstu (*Otrzymane widma masowe zawierały dużo sygnałów, które mogły pochodzić od szumów detektora, adduktów lub klastrów powstałych w roztworze inkubacyjnym i komorze jonizacyjnej.*). Na tej samej stronie (74) ciężko także znaleźć odwołanie do danych przedstawionych na Rysunku 31 pomimo, że Autorka opisuje w tekście przedstawione na nim wyniki. Przy dużych opracowaniach, takich jak recenzowana praca, ciężko jednak ustrzec się błędów. Z tej części badań Autorka wysnuwa prawidłowy wniosek wskazujący na możliwość zastosowania metody SEC-ICP-MS do skutecznego rozdziału



i analizy badanych układów małowcząsteczkowych i wielkocząsteczkowych, pozwala na analizę kinetyki przemian badanych kompleksów metali a także tworzenie adduktów z białkami. Moje zastrzeżenie budzi także brak podawania w tekście pracy wartości m/z zaokrąglonych do liczb całkowitych podczas gdy na widmach masowych widnieją także wartości dziesiętne (strona 75 w odniesieniu do Rysunku 31). Oznaczenia fragmentów struktur chemicznych związków przedstawione na rysunkach, jak w przypadku Rysunku 30 powinny zostać wyjaśnione w podpisie pod rysunkiem lub bezpośrednio na rysunku, co znacznie ułatwia interpretację przedstawionych danych. Dodatkowo uważam, że warto byłoby podać wartości mas związków przedstawionych na schematach, dla których podaje się następnie widma masowe. Przedstawiony przez Autorkę opis „Proponowana struktura”, przedstawiony w Tabeli 7 (strona 78) i powtarzający się w dalszej części tekstu, powinien być uściślony do postaci proponowana struktura chemiczna, bo o takiej właśnie strukturze jest mowa. W tabeli 8 (strona 80) zabrakło oznaczenia ładunku dla protonowanego układu biPy (jest biPy+H, powinno być [biPy+H]⁺). Opis wyników uzyskanych w ramach przeprowadzonych przez Autorkę eksperymentów jest na ogół poprawny i przedstawiony właściwym językiem naukowym choć moje zastrzeżenia budzą formy zaczerpnięte z potocznego języka, typu reakcja zachodzi (bardziej odpowiednią formą byłoby reakcja przebiega).

W opisie dotyczącym badania hydrolizy kompleksu Au^{III}OXO₆ za pomocą ESI-MS/MS (rozdział 4.1.3.4.) Autorka odwołuje się do widm masowych przedstawionych na stronie 88, poprawnie interpretując wyniki badań naukowych. Moje zastrzeżenie budzi jednak sposób prezentacji widm fragmentacyjnych dla jonu o ładunku 2+ i m/z 397,2 (Rysunek 38, panel C, strona 88). Autorka przedstawia tylko fragment widma masowego w zakresie m/z 50-400 podczas gdy w przypadku fragmentacji jonów o ładunku 2+ możliwe jest powstanie jonów o ładunku 1+ i wartości m/z większej niż m/z jonu macierzystego ale wciąż zawartej w całkowitej masie badanego związku. Jeżeli takie jony nie powstawały, to informacja o tym powinna znaleźć się w tekście pracy. Z identyczną sytuacją mamy do czynienia w dalszej części pracy, między innymi na Rysunku 40 (strona 91), dotyczącym badania hydrolizy kompleksu Au^{III}₂Phen. Analiza produktów hydrolizy auranofiny w roztworze wodnym za pomocą CE-ESI-MS/MS (rozdział 4.1.4.) przedstawia kolejną porcję interesujących wyników badań Autorki. Opis, jak i wyciągane wnioski są poprawne. Autorka kolejny raz wykazała się dużą dokładnością interpretacji uzyskanych wyników a także skrupulatnością ich opisów. W rozdziale 4.2.2. obejmującym opis zastosowania woltamperometrii w badaniach przemian kompleksów metali Autorka bardzo szybko przechodzi do przedstawienia wniosków płynących z przeprowadzonego eksperymentu podczas gdy moim zdaniem opis ten powinno rozpoczynać przedstawienie wyników. Dalsza



część opisu wyników, przedstawionych wniosków jest poprawna. Autorka skrupulatnie, krok po kroku podaje wyniki, wyciąga wnioski i umiejętnie formułuje odpowiedni przekaz w recenzowanej pracy doktorskiej. W pracy znaleźć można podsumowania obejmujące wyniki części przeprowadzonych badań co jest bardzo dobrą praktyką, szczególnie przy opracowaniach zawierających tak obszerną porcję wyników jak w pracy Pani Moniki Kupiec. W rozdziale obejmującym badanie powinowactwa kompleksów złota do składników serum (rozdział 4.3.). Rozdział 4.4. (strona 124) rozpoczyna interesujący cykl badań proteomicznych i metabolomicznych przeprowadzonych przez Autorkę nad oddziaływaniem kompleksów metali z ze składnikami cytozolu. Choć w spisie treści znaleźć można błąd w nazwie tego rozdziału („kompleksów metalize składnikami”), to ilość, jakość i wartość naukowa wyników przedstawionych przez Panią mgr inż. Monikę Kupiec jest bardzo duża. Autorka przeprowadziła wieloetapową analizę oddziaływania kompleksów metali ze składnikami cytozolu obejmującą badania z użyciem cytozolu naśladującego rakowy, cytozolu ludzkich komórek raka jelita grubego HT-29 oraz oczyszczanych lizatów komórkowych poddanych wcześniej działaniu auranofiny, stosując odpowiednie grupy kontrolne i hydrolizę enzymatyczną białek przeprowadzoną przy udziale trypsyny. Autorka podała parametry stosowanych w tej analizie metod ESI-MS, HPLC oraz CE. Zgodnie z wykazem skrótów przedstawionym na stronie 14, CE nie oznacza topionej krzemionki, jak to zostało zdefiniowane na stronie 127 rozprawy. Rozdział 4.4.1. (od strony 128) przedstawia bogate dane eksperymentalne dotyczące oddziaływania auranofiny ze związkami małocząsteczkowymi cytozolu komórkowego. Materiał został poprawnie przedstawiony w formie tabelarycznej oraz zwięźle opisany. Autorka prawidłowo opisała wyniki i wyciągnęła wnioski z przeprowadzonego eksperymentu odwołując się jednocześnie w większości poprawnie do danych literaturowych, z którymi porównuje uzyskane wyniki. Stwierdzam w większości, ponieważ odwołania takiego zabrakło na stronie 138 w akapicie „*Otrzymane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi ...*”

Kolejnym mało precyzyjnym określeniem jest „wysokość jonów fragmentacyjnych”, które zostało przedstawione na stronie 143. Powinno zostać zastąpione przez intensywność sygnałów charakteryzujących jony fragmentacyjne. Analiza proteomiczna przedstawiona w rozdziale 4.4.2.2. jest bardzo interesująca i cenna. Sposób prezentacji wyników jest poprawny choć Autorka nie ustrzegła się błędów wprowadzających niejednoznaczność opisu. Opis tabeli 23 (strona 144) „*Białka (peptydy) wykryte w cytozolu komórek MRC-5...*” jest nieodpowiedni ponieważ białka to nie peptydy. W tej samej tabeli nie podano o jakie jony chodzi w przypadku podawania masy teoretycznej i eksperymentalnej. Dodatkowo sekwencje peptydowe należy podawać z uwzględnieniem wolnej grupy aminowej końca N oraz grupy karboksylowej końca C, np.



zamiast GDYYR powinno być H-GDYYR-OH. Obserwacja jonów o ładunku wielokrotnym dla krótkich sekwencji peptydowych jest możliwa w analizie metodą spektrometrii mas, choć zależy w dużej mierze od parametrów aparatury, sekwencji peptydowej i zastosowanego roztworu/fazy ruchomej. Tutaj warto zwrócić uwagę na sekwencje H-EEK-OH, AcLIK-OH czy też H-FVR-OH, dla których Autorka zidentyfikowała jony o ładunku 2+. Moim zdaniem warto byłoby pokusić się o krótką dyskusję nad doбором parametrów pomiarowych do rodzaju obserwowanych jonów a tym samym uzyskanych wyników badań. Dodatkowo fragment H-EEK-OH został przypisany w tym samym badaniu dwóm różnym białkom (CH60 oraz MYH9). Z czego wynika taka obserwacja? Tutaj warto poddać dyskusji czynnik powodujący wybór tych dwóch białek i ich przedstawienie w tekście. Zastanawiająca jest także obserwacja peptydów zawierających w swojej sekwencji resztę cysteiny, którą grupa SH nie występuje w formie zmodyfikowanej jodoacetamidem. Pewna nieścisłość wprowadzona została w Tabeli 26. Pierwsze dwie kolumny tej tabeli nie przedstawiają wartości m/z oraz ładunków zidentyfikowanych jonów peptydów zaprezentowanych w kolumnie 3, jak można byłoby to interpretować, tylko parametry jonów potwierdzających oddziaływanie peptydów z metabolitami auranofiny. W moich rozważaniach na temat opisanych wyników pojawia się istotny aspekt, który godny byłby przedyskutowania w niniejszej rozprawie doktorskiej. Dotyczy on czułości stosowanych metod badawczych w analizie opisanych związków w próbkach biologicznych czy też natywnych roztworach substancji, wpływu matrycy na jakość uzyskiwanych danych, powtarzalności wyników oraz stabilności badanych układów po dłuższym przechowaniu próbek biologicznych zawierających wspomniane kompleksy metali czy też warunków przechowywania próbek. Choć tematy te nie zostały poruszone w pracy to są one niezwykle istotne z punktu widzenia możliwości zastosowania opracowanych przez Panią mgr inż. Monikę Kupiec metod analitycznych w przyszłych badaniach.

W części opisującej wyniki i dyskusję brakuje mi często odwołania do rozdziałów prezentujących procedury analityczne, co znacznie ułatwiłoby poruszanie się po tekście. W wielu przypadkach przedstawione wzory związków chemicznych nie uwzględniają geometrii wiązań chemicznych (strony 87, 90, 98, 108, 110). Cięcie enzymatyczne nie jest określeniem profesjonalnym, choć stosowanym. Lepiej byłoby zastosować określenie hydroliza enzymatyczna. Liczba przeprowadzonych przez Autorkę analiz, która umożliwiła uzyskanie przedstawionych w pracy wyników była bardzo duża, choć w mojej ocenie posługiwanie się wielokrotnie formą bezosobową w przedstawianiu wyników badań naukowych nie tylko umniejsza rolę Autorki w ich uzyskaniu ale także nie potwierdza jej jednoznacznej samodzielności. Praca realizowana była przy współpracy naukowej ośrodków, co Autorka



podkreśliła na stronie 61 w przypadku opisu pochodzenia kompleksów KP1019 oraz Au₂Phen co daje możliwość posługiwania się formą bezosobową w częściach pracy dotyczących aspektów wykonanych przez osoby inne niż Autorka. Zdaję sobie sprawę z faktu, że wskazany sposób opisu może być konsekwencją przygotowywania prac naukowych w języku angielskim, w którym forma bezosobowa albo forma pierwszej osoby liczby mnogiej jest dominująca. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na brak opisu syntezy badanych związków oraz wyników ich charakterystyki metodami spektroskopowymi. Czy takie analizy były przeprowadzone, czy badany związek został oczyszczony? Czy przed badaniem potwierdzona została tożsamość związku?

Pracę kończy poprawnie przygotowane podsumowanie i wnioski oraz spis bibliografii. Te części pracy przygotowane są poprawnie. W mojej opinii przy odwoływaniu się do stron internetowych powinna znaleźć się data dostępu. Dodatkowo znaleźć można drobny błąd w nazwisku w pozycji 117 (jest P. Sudera, powinno być P. Suder).

Wymienione błędy, nieścisłości i uchybienia przedstawiam z obowiązku recenzenta. Nie są one na tyle znaczące aby mogły zaburzyć czy uniemożliwić pracę z tekstem czy też powtórzenie przeprowadzonych i opisanych przez Autorkę eksperymentów. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej przez Panią mgr inż. Mają bardzo duże znaczenie poznawcze i praktyczne. Należy podkreślić, że Doktorantka opracowała metody analityczne, które mogą znaleźć zastosowanie w charakterystyce potencjalnych leków w postaci kompleksów metali przejściowych o właściwościach cytostatycznych, ich przemian farmakokinetycznej czy doprowadzić do określenia mechanizmu ich działania. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia rozwoju współczesnej farmacji czy medycyny. Swoimi badaniami Doktorantka przyczyniła się tym samym do dalszego rozwoju spektrometrii mas. W związku z powyższym stwierdzam, że zaproponowane w pracy podejście stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które jednocześnie otwiera szereg nowych możliwości badawczych.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki badań uzyskanych w ramach realizacji pracy doktorskiej przez Panią mgr inż. Monikę Kupiec, które bezpośrednio dotyczą jej tematyki, zostały przedstawione w sześciu pracach, z których cztery stanowią publikacje naukowe w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym współczynniku Impact Factor wynoszącym 16,165. Doktorantka jest także autorką dwóch monografii w języku polskim, stanowiących część dorobku naukowego będącego konsekwencją realizacji pracy doktorskiej. Wyniki badań naukowych doktorantki prezentowane były w formie ustnej jak i w formie plakatu na licznych konferencjach naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym, za które została



uhonorowana także nagrodami naukowymi (nagroda za zawartość merytoryczną plakatu, Konferencja „Analityczne zastosowanie chromatografii cieczowej” 2015 i 2016). Należy także dodać, że wykaz dorobku naukowego przesłany wraz z recenzowaną rozprawą doktorską prezentuje także szereg innych prezentacji konferencyjnych. Moim zdaniem potwierdza to jednoznacznie duży udział Pani mgr inż. Moniki Kupiec w przedłożonym do recenzji opracowaniu, a także wskazuje na jej dojrzałość naukową. Podsumowując, zgromadzony przez Autorkę dorobek naukowy oceniam bardzo wysoko i uważam go za w pełni wystarczający do uzyskania stopnia doktora.

W podsumowaniu stwierdzam, że iż wyniki badań naukowych oraz wnioski z nich płynące, które zostały zawarte w recenzowanej rozprawie doktorskiej wskazują, że cel pracy został w pełni zrealizowany a Pani mgr inż. Monika Kupiec opanowała posługiwanie się nowoczesnymi technikami badawczymi i posiadała umiejętność sprawnego prowadzenia pracy naukowej wraz z wnikliwą analizą i interpretacją uzyskanych wyników. Reasumując, mgr inż. Monika Kupiec przedstawiła w swojej rozprawie doktorskiej wiele nowych i oryginalnych wyników badań w dyscyplinie nauki chemiczne, które pozwoliły na sformułowanie wartościowych wniosków. W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Kupiec spełnia wymogi i warunki określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, stawiane pracom składanym przez osoby ubiegające się o stopień naukowy doktora i wnosząc do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Remigiusz Bzchov