

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Barbary Czaplińskiej pt.:

Analiza właściwości spektroskopowych w projektowaniu sond/sensorów komórkowych

Promotor: dr hab. Robert Musioł

Fluorescencyjne sondy molekularne znajdują obecnie szerokie zastosowanie w monitorowaniu m.in. zmian środowiska, identyfikacji żywności genetycznie zmodyfikowanej oraz śledzeniu aktywności komórek *in vitro*. Ponadto, w ostatniej dekadzie obrazowanie fluorescencyjne stało się wszechstronnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach klinicznych ze względu na unikatowe możliwości wizualizacji cech anatomicznych i szczegółów morfologicznych na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Wizualizacja tych zjawisk jest możliwa dzięki wprowadzeniu do organizmu odpowiednio skonstruowanych znaczników fluorescencyjnych, które wiążą się ze specyficznymi elementami struktury tkankowej, co pozwala na przestrzenną ocenę tych struktur oraz monitorowanie procesów w nich zachodzących. Szczególnie interesująca jest możliwość wykorzystania tych sond w analizie oddziaływań, które odpowiadają za rozwój procesów chorobotwórczych, jak również do śledzenia farmaceutyków w trakcie ich interakcji z biocząsteczkami.

Nowoprojektowane sondy fluorescencyjne powinny charakteryzować się wysoką wydajnością kwantową fluorescencji, długim czasem życia fluorescencji oraz odpornością na fotowysbielenie. Istotne są również takie cechy jak: wąskie spektrum emisji, dobra fotostabilność i wysoka wartość przesunięcia Stokesa'. Ponadto, ważne jest, aby właściwości fluorescencji nie były zależne od lokalnego środowiska, odmiany biocząsteczki oraz czystej postaci koniugatu. Barwnik powinien również charakteryzować się dobrą rozpuszczalnością, wysoką stabilnością chemiczną i środowiskową, brakiem toksyczności oraz wysoką biodostępnością. Powinien także selektywnie wiązać się z określonym typem komórek, tkanek lub organelli, wykazując kompatybilność ze źródłem wzbudzenia. Ponieważ barwniki takie są stosunkowo tanie w produkcji oraz łatwe w modyfikacji, obecnie badania nad nowymi sondami molekularnymi są priorytetowe w wielu ośrodkach naukowych na świecie.

Przedłożona mi do oceny dysertacja mgr Barbary Czaplińskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy. Rozprawa została wykonana pod opieką dr hab. Roberta Musioła w Zakładzie Chemii Organicznej, w Instytucie Chemii na Uniwersytecie Śląskim. Pracę zbudowano zgodnie z obowiązującymi kanonami przyjętymi dla pracy doktorskiej według obowiązujących kryteriów. Należy podkreślić, że Doktorantka zrealizowała swoje badania dzięki finansowaniu z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki - OPUS (DEC-2013/09/B/NZ7/00423).

Całość rozprawy obejmuje 116 stron maszynopisu i podzielona jest na 7 głównych rozdziałów (tj. cel i założenia pracy, wstęp czyli część literaturowa, badania własne, podsumowanie, część eksperymentalna zawierająca materiały i metody, literatura oraz dorobek naukowy doktorantki). W pracy umieszczono kilkanaście wykresów, rysunków, schematów i zdjęć, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Choć znajdujący się na końcu pracy rozdział dotyczący stosowanych metod w mojej opinii powinien się znaleźć na początku rozprawy, tuż po wstępie co ułatwiłoby czytanie rozprawy oraz interpretację wyników.

Cancer Research UK and
Cancer Imaging Centre at
The Institute of Cancer Research
and The Royal Marsden NHS
Foundation Trust

15 Cotswold Road, Sutton
Surrey, SM2 5NG

T +44 20 8722 4412
E ekramermarek@icr.ac.uk
www.icr.ac.uk

Registered office
The Institute of Cancer Research:
Royal Cancer Hospital
123 Old Brompton Road
London SW7 3RP

A Charity. Not for Profit.
Company Limited by Guarantee.
Registered in England No. 534147.
VAT Registration No. 849 0581 02

2 of 5

Doktorantka postawiła sobie za **CEL** zsyntetyzowanie oraz przeanalizowanie właściwości spektroskopowych nowych związków chemicznych opartych o strukturę chinoliny. Związki te można wykorzystać jako fluorofory przy projektowaniu sond służących w badaniach struktur komórkowych oraz procesów zachodzących na poziomie komórkowym ocenianych z wykorzystaniem np. mikroskopii fluorescencyjnej czy konfokalnej. Postępowanie takie oparte jest na założeniu, że chinolina, ze względu na małą masę cząsteczkową i obecność atomu azotu, dającego dobre właściwości koordynacyjne, jak i możliwość tworzenia wiązań wodorowych jest atrakcyjną strukturą w projektowaniu nowych fluoroforów. Te z kolei, odpowiednio zaprojektowane, mogą być sensorami właściwości fizykochemicznych czy biochemicznych poprzez dostarczanie informacji stanowiącej odpowiedź na warunki panujące w danym układzie biologicznym, np. pH.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi ambitny projekt badawczy, nie mniej jednak z obowiązku Recenzenta chciałbym zasygnalizować kilka kwestii, które mają na celu udoskonalenie warsztatu badawczego Doktorantki.

Uwagi szczegółowe:

Klarownie zredagowany na 17 stronach **WSTĘP** (ubarwiony 12 rysunkami i 1 tabelą) stanowi omówienie:

- zjawiska fluorescencji;
- modelu budowy i mechanizmu działania chemosensorów;
- budowy i funkcji poszczególnych struktur komórkowych;
- barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych w monitorowaniu poszczególnych organelli komórkowych tj. mitochondrium, lizosomy, aparat Golgiego czy jądro komórkowe.

Ta część pracy jest ciekawa, ale zawiera kilkanaście błędów edycyjnych i mogłaby być staranniej opisana. Występują w niej bowiem:

- błędy związane z nomenklaturą poszczególnych związków.
- czasami występują zdania bez związku (np. ostatnie zdanie na str. 19).
- oraz sformułowania nienaukowe: *„kruchość komórek ludzkich i zwierzęcych”* (Str. 11) – komórki nie są kruche. Podobnie w kolejnym zdaniu na tej samej stronie Doktorantka pisze: *„sondy, które akumulują się w komórce, bądź łączą z celem naszego zainteresowania, aktywują proces fluorescencji”*; sonda sama w sobie nie aktywuje tego procesu, musi być wzbudzona, aby wyemitować światło. W kolejnym zdaniu Doktorantka pisze: *„Ponadto, na przestrzeni ostatnich lat, fluorescencyjne biosensory zyskały popularność jako czułe narzędzia do badania i odkrywania nowych miejsc wiązania.”* – co Doktorantka miała tutaj na myśli?
- Tabela 1 przedstawia listę wraz z opisem barwników przeznaczonych do wizualizacji mitochondriów. Tabela ta została przepisana z Ref. 36 (2006) a powinna zostać również uzupełniona o najnowsze fluorofory. Co więcej, dla reszty organelli komórkowych przedstawione zostały na rysunkach jedynie same struktury związków, bez referencji.
- Str. 15 – Doktorantka w pierwszym paragrafie wprowadza technikę ESPIT, w drugim paragrafie się powtarza i tutaj wprowadza dopiero angielski skrót.
- Rys 1 – zawiera anglojęzyczne skróty jak GS (ang. ground state), które nie są tłumaczone, a wydaje mi się, że dobrze byłoby je tutaj dodać, zwłaszcza, że w późniejszej części pracy Doktorantka takie skróty umieszcza.
Niewątpliwie łatwo można zauważyć w tej części pracy, jak również w pozostałych rozdziałach, podobny brak konsekwencji.
- Rys. 2 jest mało przejrzysty. Warto by go uzupełnić o przykłady sond fluorescencyjnych. Czy Doktorantka mogłaby np. wymienić, które sondy najczęściej wykorzystywane są do obrazowania wiązań wodorowych?
- Doktorantka nie zachowuje kolejności rysunków w pracy: po Rys. 8 jest w tekście Rys. 10 na Str. 24 a po nim Rys. 9.

3 of 5

- Rys. 8 – rysunek Mito Tracker Red jest niepoprawny.
- Rys.11b – lewa część związku jest narysowana niepoprawnie (brakuje atomu azotu);
- Str. 20 – Czy Doktorantka mogłaby omówić dlaczego uważa, że mitochondrium i lizosomy to struktury komórkowe, które są najczęstszymi obiektami zainteresowania jeżeli chodzi o ich obrazowanie?
- Str. 21 – Doktorantka mówi tutaj o apoptozie, natomiast dopiero na Str. 24. wyjaśnia czym jest to zjawisko.
- Str. 24 – Czy Doktorantka mogłaby omówić w jaki sposób monitorowanie lizosomów może przyczynić się do efektywniejszej diagnostyki?
- Str. 26 – Czy Doktorantka mogłaby wyjaśnić jaka jest różnica pomiędzy barwnikiem DAPI i Hoechst (pomijając oczywiście różnice w strukturze)?
- W tej części pracy brakuje również w referencjach kilku pozycji np. Nature Reviews, które w ostatnich latach zostały opublikowane i świetnie podsumowują obecny stan wiedzy na temat sond fluorescencyjnych.

Część **BADANIA WŁASNE** opisuje bardzo interesujące i szeroko rozbudowane badania, zawierające zarówno syntezę, badania strukturalne oraz charakterystykę spektralną pochodnych chinoliny. Część chemiczna została dobrze przemyślana, potwierdzeniem tego jest dobór materiału badawczego i metod jakie Doktorantka wykorzystwała. Syntezy opierają się na znanych metodach. Dużym atutem jest synteza z użyciem pola mikrofalowego. Jest to metoda nowoczesna i niejednokrotnie pozwala znacznie skrócić czas syntezy oraz zwiększyć jej wydajność. Strona analityczna, potwierdzająca budowę otrzymanych związków jest również poprawna. Na uwagę zasługują obliczenia teoretyczne wykonane w celu uzupełnienia wiedzy uzyskanej z pomiarów spektroskopowych wykonane z wykorzystaniem teorii funkcjonału gęstości DFT. Ta część pracy dodatkowo została wzbogacona o badania wykonane w układzie *in vitro* na modelu komórkowym przy użyciu linii ludzkiego raka jelita grubego HCT116 oraz prawidłowej linii ludzkich fibroblastów NHDF.

W tej części pracy należałoby również zwrócić uwagę na kilka istotnych szczegółów:

- Rys. 13a – nie ma podanych podstawników R1 i R2. Więc zdanie: „*Za przykład mogą posłużyć struktury przedstawione na Rysunku 13a, które stosowane są do barwienia DNA i RNA*”, sugeruje, że pod 13a jest kilka struktur (a Doktorantka przedstawia tylko jedną z bliżej nieokreślonych podstawnikami).
- Rys. 14 – wymieniono związki 6f–6k, ale w tabeli podano podstawniki tylko do ‘f’; jakie są podstawniki dla 6g, 6h, 6i, 6j i 6k? Podstawik butylowy to Bu, a nie Bt.
- Rys. 15 – brakuje widma dla 6f. Czy na osi y nie powinno być molowego współczynnika absorpcji zamiast absorbancji (patrzac na dane liczbowe)?
- W tekście brakuje Tabeli 3, o której jest mowa na stronie 31, powinny być w niej zamieszczone dane dotyczące solwatochromizmu.
- Rys. 16 – brakuje jednostki intensywności fluorescencji ([au] ?)
- Rys. 17 – należałoby omówić nieco obszerniej.
- W Tabeli 2 (Str. 31) wydajności kwantowe podane są w %, potem Doktorantka podaje je bezwymiarowo. Doktorantka powinna trzymać się jednej konwencji, co ułatwiłoby porównanie wyników.
- Str. 38 – zasady Schiffa nie mogą być *jednostkami przeciwwgrzybicznymi, przeciwbakteryjnymi* To zdanie należałoby inaczej napisać.

4 of 5

- Str. 39 – jakich związków dotyczy Rys. 22? Jakie związki kryją się pod poszczególnymi oznaczeniami?
- Rys. 22 – związek 2 na tym rysunku jest związkiem oznaczonym jako SC2 w dalszym tekście.
- Str. 29 – mała różnica energii pomiędzy orbitalami HOMO i LUMO – „*mała różnica*” jest pojęciem względnym, ile ta różnica wynosiła?
- Str. 30 – Doktorantka wprowadza pojęcie przesunięcia batochromowego, które jednak tłumaczy w tekście dużo później (Str. 43).
- Str. 30 – Czy doktorantka uczesliżyła w badaniach biologicznych czy były one wykonane przez kogoś z grupy Dr Katarzyny Malarz? Ta kwestia nie była dla mnie jasno określona w pracy.
Rys. 18 – Czy to są zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego czy konfokalnego? Skala na zdjęciach jest zupełnie niewidoczna, wielkość pasków odpowiadających skali jest też różna, choć wydaje się, że zdjęcia zostały zarejestrowane dla tego samego powiększenia. Po jakim czasie od podania związku te zdjęcia były rejestrowane? Jakie były warunki tego eksperymentu? Doktorantka powinna używać skrótu *godz.* a nie *h*, skoro zdecydowała się na polski opis rysunków i *nałożenie obrazów* a nie *merge*.
Ponadto, błędne jest stwierdzenie, że związek 6k gromadzi się w błonie komórkowej. Na zaprezentowanych zdjęciach (Rys. 18) nie ma niestety wybarwionych błon komórkowych, jest natomiast silnie wybarwiona cytoplazma.
- Rys. 20 – powinien być znacznie lepiej opisany.
- Str. 38 – „*Postanowiono zsyntetyzować*” – kto w efekcie syntetyzował te związki? Ze względu na złożoność pracy, Doktorantka janso powinna określić jaki był jej udział w poszczególnych eksperymentach.
- Str. 39 – jakich związków dotyczy Rys. 19? Jakie związki kryją się pod poszczególnymi oznaczeniami?
- Str. 42 – H26 (proton pierścienia fenyłowego) i H23 (proton wiązania iminowego) powinno być odwrotnie co potwierdza rysunek 26.
- Str. 43 – Doktorantka podaje, że widma absorpcji i emisji zmierzono dla rozpuszczalników o różnej polarności, natomiast na Rys. 27 oraz Tabeli 4 są tylko wyniki dla etanolu. Zastanawiam się gdzie są pozostałe i dlaczego nie zostały uwzględnione w dyskusji?
- Str. 44 – Tabela 4, co było związkiem referencyjnym w przypadku pomiarów wydajności kwantowej fluorescencji?
- Rys. 28 – podobnie jak wyżej na wykresach brakuje jednostki.
- Str. 59 – o ile poprawne jest stwierdzenie w dyskusji, że nie obserwowano cytotoksyczności dla stężenia na poziomie 25 μM , to napisanie w Tabeli $\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$ nie jest właściwe. Należało tutaj podać wyznaczone w eksperymencie IC_{50} dla każdego związku. Jakim testem mierzono cytotoksyczność? W dalszej części tego rozdziału Doktorantka wspomina test MTS. Czy ten test był używany również w tym przypadku?
- Str. 59 – „*warunki eksperymentu dobrano w sposób zapewniający najkrótszy możliwy czas inkubacji i pomiaru sygnału, co zapewnia odpowiednie stężenie wprowadzonego barwnika*”. Czy Doktorantka mogłaby precyzyjniej wyjaśnić to zdanie.
- Str. 60 – co znaczy „*znikome stężenie w lizosomach*”?
- Rys. 36 – jak wyżej brak jednostki na osi y.
- Rys. 40 – występuje w pracy dwukrotnie (Str. 66 oraz 67), a Rys. 45 występuje w pracy przed Rys. 44.
- Str. 70 – zdjęcia fluorescencyjne zbierane były w różnych czasach, w tym przypadku po 2 godz, wcześniej po 1 godz. z czego to wynikało?

5 of 5

- Str. 71 – Tabela 16 – uwaga ta sama jak w przypadku Tabeli 11. Ponadto, Doktorantka pisze, że inkubacja ze związkami nie wpłynęła na żywotność komórek, ale nie pisze po jakich czasach ta żywotność była oceniana. Co więcej, Doktorantka podaje: *właściwości absorpcyjne badanego związku umożliwiają wzbudzenie go przy użyciu barwnika DAPI*. Rozumiem, że chodzi tutaj, o możliwość wykorzystania tej samej długości fali do wzbudzenia badanego związku i DAPI. Nie można wzbudzić związku przy użyciu DAPI.
- Str. 73, Rys. 44 – zdjęcia mikroskopowe, czy to były zdjęcia zebrane przy pomocy mikroskopu konfokalnego? W tym wypadku znowu podpis wskazuje na 2 godz. inkubację, w tekście była mowa o 1 godz.
- Str. 75 – jeżeli barwnik 6s gromadzi się zarówno w komórkach rakowych jak i prawidłowych, czy Doktorantka mogłaby skomentować czego możemy spodziewać się w związku z tym wykorzystując takie sondy w badaniach np. *ex vivo* w materiale tkankowym czy *in vivo*.
- Rys. 48 – brak odchyleń standarowych.
- Rys. 52 – znaczące braki w opisie.

PODSUMOWANIE przedstawione przez Doktorantkę jest merytoryczne i przekonujące.

METODYKA PACY w moim odczuciu ten dział dysertacji powinien być napisany bardziej szczegółowo i zostać rozbudowany. Aktualnie czytający na podstawie przedstawionych w tym rozdziale informacji nie jest w stanie odtworzyć metodyki przeprowadzonych eksperymentów.

Niestety, dużym minusem jest całkowity brak opisu metodyki wykonania badań biologicznych, co znacznie utrudniło czytanie pracy.

W rozprawie Doktorantka wykazała się znajomością 109 **POZYCJI LITERATUROWYCH**, z których 43 prace zostały opublikowane przed 2010 r. W mojej opinii Doktorantka winna była pokusić się o dodanie pozycji literaturowych, które przedstawiałyby aktualny (czyli z ostatnich 5 lat) status badań prowadzonych w tej tematyce badawczej.

Przytoczone w niniejszej recenzji uwagi krytyczne i dyskusyjne nie podważają w żadnej mierze dużej wartości naukowej rozprawy i jej pozytywnej oceny. Reasumując, uważam, że uzyskane wyniki badań, mają dużą wartość poznawczą jak i potencjalnie aplikacyjną. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż uzyskane wyniki badań prezenowane były na konferencjach w kraju jak i za granicą, a część z nich została opublikowana.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym z późn. zm. **W związku z tym wnoszę do Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Barbary Czaplińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Gabriela Kramer-Marek, Dr. hab.

Team Leader, Preclinical Molecular Imaging

