



# Politechnika Łódzka

Instytut Biochemii Technicznej

Łódź, dn. 12.02.2018 r.

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach  
Instytut Biochemii Technicznej  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul Stefanowskiego 4/10  
90-924 Łódź

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Justyny Milczarek zatytułowanej

### **„Badania skoniugowanych oligoelektrolitów jako potencjalnych sond fluorescencyjnych do barwienia membran komórkowych”**

wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej  
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk  
pod kierunkiem dr hab. Arkadiusza Chworosia

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jej autorka, mgr Justyna Milczarek podejmuje zadanie ewaluacji serii sprzężonych oligoelektrolitów w kierunku ich zastosowania jako sond fluorescencyjnych. Tematyka prac wykonanych w ramach przewodu doktorskiego jest częścią prowadzonych w grupie dr hab. Arkadiusza Chworosia badań nad nowymi znacznikami do obrazowania komórek i selektywnej detekcji struktur wewnątrzkomórkowych.

Mikroskopia fluorescencyjna stanowi obecnie jedną z kluczowych technik stosowanych w biologii komórki oraz naukach biomedycznych. Zastosowanie selektywnych fluorochromów umożliwiło wybiórcze obrazowanie komórek i struktur subkomórkowych, często bardzo trudnych, lub wręcz niemożliwych do zobrazowania za pomocą klasycznego mikroskopu świetlnego. Obecnie dostępna jest ograniczona liczba fluorochromów, które wiążą się specyficznie do błon określonych organelli komórkowych. Wśród nich wyróżnić można barwniki wiążące się do błon aparatu Golgiego, mitochondriów, gładkiej siateczki śródplazmatycznej, lizosomów, czy błony komórkowej. Jednak ze względu na ograniczoną liczbę dostępnych barwników oraz ich toksyczność, niską selektywność oraz wydajność kwantową, wciąż poszukuje się nowych, bardziej wydajnych i/lub selektywnych fluoroforów, które mogłyby być wykorzystywane także do barwień „przyżyciowych”. Interesująca w tym kontekście jest obserwacja, iż skoniugowane polielektrolity (CPEs, ang. *Conjugated PolyElectrolytes*) oraz skoniugowane oligoelektrolity (COEs, ang. *Conjugated OligoElectrolytes*) mogą stanowić obiecujące narzędzia do bioobrazowania. Rozprawa doktorska mgr Justyny Milczarek doskonale wpisuje się w ten nurt badań i jest poświęcona analizom właściwości biologicznych sprzężonych oligoelektrolitów opartych na rdzeniu fenylenowinyleniu (PV-COEs) oraz bis-(4-aminostyrylo)naftalenu (SN-COEs).

Instytut Biochemii Technicznej

90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10, budynek 2A

tel.: +4842 631-34-42; +4842 631- 34-33; tel/fax: +4842 636-66-18; e-mail: biochem@p.lodz.pl





Przedstawiona do recenzji praca ma klasyczny układ. Autorka na 148 stronach przedstawiła część teoretyczną i eksperymentalną wraz z dyskusją wyników. Na początku pracy znajdują się streszczenia w wersji polsko- i angielskojęzycznej, wykaz stosowanych skrótów oraz cel badań wraz z wypunktowaniem celów szczegółowych. Praca zawiera także wykaz osiągnięć Doktorantki w postaci publikacji, patentów oraz materiałów konferencyjnych.

W części literaturowej Autorka w kompetentny sposób dokonuje charakterystyki techniki bioobrazowania optycznego ze szczególnym naciskiem na opis fotoluminescencji. Część ta przedstawia podstawy fizyczne oraz właściwości zjawiska fluorescencji, metody detekcji oraz przegląd metod mikroskopowych, w tym mikroskopię fluorescencyjną, konfokalną oraz zaawansowane techniki mikroskopowe. Następnie Doktorantka w sposób szczegółowy omawia sondy fluorescencyjne z wyszczególnieniem białek fluorescencyjnych oraz sond opartych na małych cząsteczek organicznych i nanocząsteczkach. Podrozdział trzeci z części literaturowej poświęcony jest aspektom związanym ze skoniugowanymi poli- i oligoelektrolitami i stanowi doskonałe uzasadnienie wyboru obiektu badań. Podsumowując, przegląd literaturowy jest pełny, oparty na najnowszej literaturze i wprowadza czytelnika w tematykę pracy.

Rozdział III poświęcony jest opisowi syntezy obiektów badań i zastosowanej metodyce. W opisie metody hodowli komórek HUVEC nie znalazłam źródła zakupu suplementu ECGS. Jest to drobne niedopatrzenie, jednakże ze względu na to, że dodawana ilość podawana jest w  $\mu\text{L}$ , a nie w postaci stężenia końcowego w medium hodowlanym, jest to ważna informacja.

Część eksperymentalna pracy koncentruje się wokół czterech głównych zagadnień t.j. określenia cytotoksyczności badanych związków w stosunku do wybranych linii komórkowych, oceny właściwości spektralnych badanych związków za pomocą spektroskopii UV-VIS i spektrofluorymetrii, obrazowania za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej oraz analizy wewnątrzkomórkowej intensywności fluorescencji badanych związków za pomocą sortowania heterogennej mieszaniny komórek aktywowanych fluorescencją (FACS). W tym miejscu nie sposób nie wspomnieć o znacznej liczbie analizowanych znaczników oraz modeli komórkowych. Przebadano bowiem cztery pochodne PV-COE (trójpięścieniowy DSBN+, czteropięścieniowy DSSN+ i COE1-4C, pięciopięścieniowy COE1-5C+) oraz siedem pochodnych SN-COE (trimetyloamoniowa DSNN-NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, aminowa DSNN-NH<sub>2</sub> oraz pirydyniowa DSNN-Py<sup>+</sup>, fosfonianowa DSNN-P, morfolinowa DSNN-Mor, hydroksyetylowa DSNN-DEA oraz potasowa sól fosfonianowa DSNN-POK). W badaniach wykorzystano także dziewięć modeli komórkowych: HUVEC, HeLa, 293T, HCT116, MDM, NIH/3T3, K562, MOLT4 oraz ludzkie fibroblasty skóry. Wśród wymienionych komórek znajdują się zarówno modele prawidłowe, jak również zmienione nowotworowo. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę właśnie na ten podział,





który Doktorantka zastosowała w swojej pracy. Do modeli komórek prawidłowych zalicza bowiem nie tylko śródbłonek żyły pępowinowej (HUVEC), ale również linię ludzkich embrionalnych komórek nerki 293T oraz mysie komórki mezotelium otrzewnej MDM. Te dwie ostatnie linie to genetycznie modyfikowane unieśmiertelnione komórki, charakteryzujące się szybkim tempem proliferacji. Zgodnie z informacją, którą zamieszcza Autorka, komórki 293T zostały zakupione z Amerykańskiego Banku Linii Komórkowych ATCC. Na stronie ATCC znajdujemy informację, iż linia ta została wygenerowana poprzez transformację prawidłowych ludzkich komórek nerki za pomocą DNA adenowirusa. Komórki te są poliploidalne (hypotriploidalne) i 30% populacji zawiera 64 chromosomy. Z kolei producent linii komórkowej MDM, Celther Polska, informuje, że linia komórkowa MDM została ustabilizowana za pomocą dużego antygenu SV40 i charakteryzuje się wysoką proliferacją. Z wyżej wymienionych powodów sugerowałabym używanie w stosunku do opisanych wyżej linii terminu „komórki unieśmiertelnione” zamiast „prawidłowe”.

Pierwszym etapem prowadzonych badań było określenie wpływu badanych związków na przeżywalność wybranych linii komórkowych w zakresie stężeń od 1 do 10  $\mu\text{M}$  (w przypadku komórek K562 1-20  $\mu\text{M}$ ) w trzech różnych czasach inkubacji. Dodatkowo przeprowadzono kontrolę integralności błony komórkowej z wykorzystaniem barwników wnikających do wnętrza komórki jedynie w warunkach permeabilizacji błony (jodek propidyny, bromek etydyny oraz 7-aktynomycyna D). Uzyskane wyniki badań cytotoksyczności wykazują, że testowane sprzężone oligoelektrolity mogą być używane jako sondy fluorescencyjne w wybranych ludzkich i zwierzęcych liniach komórkowych w efektywnym stężeniu 1-2  $\mu\text{M}$ , a dłuższe analogi (4-5 pierścieniowe) mogą być stosowane w wyższych stężeniach (10  $\mu\text{M}$ ).

Odnosnie tej części badań mam następujące wątpliwości:

- Zastanawiające jest, jaki był powód zastosowania innego zakresu stężeń w badaniach cytotoksyczności związków z grupy pochodnych fenylenowinylenowych w przypadku linii komórkowej K562.
- Zauważyłam również pewną nieścisłość odnośnie stosowanego związku kontrolnego. W rozdziale Materiały i Metody Doktorantka pisze na stronie 53, iż jako związek referencyjnego w teście MTT stosowano 1  $\mu\text{M}$  staurosporynę. Z kolei w opisie wyników dowiadujemy się, iż jako związek referencyjny wykorzystywano siarczan dodecyłu sodu (brak podanego stężenia).
- Autorka pisze, że celem przeprowadzonych testów MTT była weryfikacja wpływu badanych związków nie tylko na żywotność komórek, ale również na proces adhezji komórkowej w różnych mediach hodowlanych. Autorka wyciąga wniosek, iż spadek przeżywalności w przypadku podłoża HBSS bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  prawdopodobnie wpływa z braku  $\text{Ca}^{2+}$ , które są istotne dla białek z rodziny transbłonowych glikoprotein (kadheryn) odpowiedzialnych za adhezję zależną od wapnia.





Niewątpliwie aktywność kadheryn jest uzależniona od obecności zewnątrzkomórkowych jonów  $Ca^{2+}$ , jednakże rola jonów wapnia jest znacznie szersza i w komórkach istnieje duża liczba procesów zależnych od regulacji wapniowej. Tymczasem sam test MTT w konfiguracji zastosowanej przez Doktorantkę nie jest metodą stosowaną do analizy stopnia adhezji komórek do podłoża. Być może jednak Autorka opiera ten wniosek o wyniki analizy obrazów mikroskopowych nie zamieszczonych w dysertacji?

- Dlaczego wstępne eksperymenty określenia cytotoksyczności badanych związków z grupy pochodnych naftalenowych po 24-godzinnej inkubacji przeprowadzono na innych liniach komórkowych (linia 293T i HCT116) niż w przypadku pochodnych fenylenowinylenowych (linia 293T i HeLa)?
- Dlaczego przy określeniu cytotoksyczności badanych związków z grupy pochodnych naftalenowych brak danych dla komórek HUVEC po 48 godzinach inkubacji, skoro dla wszystkich pozostałych modeli komórkowych takowe zamieszczono?
- Na stronie 64 pod Wykresem 1 zamieszczono informację, że słupki przedstawiają średnią + SD. Kolejne wykresy zawierają słupki ze średnią + SE. Skąd taka niekonsekwencja?
- Poza tym w całej pracy brak obliczeń istotności statystycznej pomiędzy próbami, gdzie niekiedy obserwowane są subtelne różnice. Proponowałabym w przyszłości zastosowanie chociażby podstawowych obliczeń statystycznych.
- Czy stosując test MTT stosowano kontrolę samego podłoża hodowlanego z badanymi związkami?

W kolejnym etapie pracy Doktorantka zbadała właściwości spektralne badanych związków po ich wbudowaniu do błon komórkowych na przykładzie komórek HeLa, K562 i MOLT4. Porównując widma emisji dla roztworu badanych PV-COEs w roztworze soli fizjologicznej oraz wewnątrz komórek w większości zaobserwowano zwiększające się od komórek MOLT4, przez K562 do komórek HeLa przesunięcie hipsokromowe sugerujące wzrost hydrofobowości. Dla związków z grupy SN-COEs zarejestrowano widma ekscytacji i emisji pochodnych roztworów badanych związków w rozpuszczalnikach o różnej polarności (woda, metanol, DMSO). Poza tym, podobnie jak w przypadku PV-COEs, dla większości pochodnych SN-COEs zaobserwowano zwiększające się od komórek K562 do HeLa przesunięcie hipsokromowe lew. Czy podczas analiz dokonano pomiaru widm w pełnym podłożu do hodowli komórek?

Trzeci rozdział dotyczy obrazowania za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej. Jest niewątpliwie najbardziej spektakularną częścią pracy i jednocześnie dowodem, że postawione cele zostały osiągnięte. Wykazano, że COEs, niezależnie od warunków inkubacji, modelu komórkowego oraz procesu utrwalania komórek, lokalizowały się w wewnątrzkomórkowych strukturach lipidowych, a eksperymenty kolokalizacyjne





potwierdziły ich obecność w siateczce śródplazmatycznej oraz aparatach Golgiego. Nie zaobserwowano lokalizacji w jądrach komórkowych, ale wykazano możliwość ich wykorzystania do wizualizacji pęcherzyków apoptotycznych. Na uwagę zasługuje również fakt, że barwniki komercyjne wykazywały mniejszą selektywność niż badane skoniugowane oligoelektrolity, a stężenia COEs potrzebne do efektywnego wybarwienia komórek są niższe niż stężenia, w których używa się komercyjnych barwników.

Ostatni rozdział opisujący wyniki prac eksperymentalnych dotyczy analizy wewnątrzkomórkowej intensywności fluorescencji badanych związków metodą sortowania komórek aktywowanych fluorescencyjnie. Dla wszystkich badanych związków odnotowano zależny od stężenia wzrost intensywności wewnątrzkomórkowej fluorescencji. Na podstawie analiz mikroskopowych i FACS stwierdzono, że najlepszymi kandydatami spośród testowanych COEs są DSSN+, COE1-5C+, DSNN-NMe3+ oraz DSNNDEA.

Niewątpliwie realizacja założonych celów wymagała od Doktorantki przeprowadzenia wielu eksperymentów w laboratorium oraz dogłębnych i czasochłonnych studiów literaturowych. Wszystkie przedstawione badania zawarte w przedłożonej do oceny pracy zostały wykonane i opisane poprawnie. Rozdziały części eksperymentalnej kończą się zwięzłym podsumowaniem i trafnymi wnioskami. Część badań, jakie przedstawiła Doktorantka w swojej pracy doktorskiej znalazły już odzwierciedlenie w trzech publikacjach naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej (Chemical Communications, Journal of Photochemistry and Photobiology B, New Journal of Chemistry), w rozdziale w książce „Na pograniczu chemii i biologii” oraz w jednym patencie. Dorobek ten świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki w prace badawcze, a także potwierdza wysokie kompetencje Promotora pracy.

W pracy nie znajdują poważniejszych błędów czy też istotnych niedociągnięć, czytało się ją bardzo dobrze. Zdarzyły się bardzo drobne błędy literowe (w tym na pierwszej stronie w tytule pracy). Wymienię natomiast kilka drobnych uwag merytorycznych:

- strona 4: 60 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego odbył się we Wrocławiu, a nie w Gdańsku
- strona 16: Dlaczego w wykazie skrótów w nazwach związków Doktorantka przedrostek „bis” czasami pisze z wielkiej, a czasami z małej litery?
- strona 25: Cytat „Organizmy żywe swoje właściwości bioluminescencyjne wykorzystują w interakcjach z otoczeniem, natomiast w świecie naukowym odtworzenie tych właściwości pozwala na badanie interakcji między komórkami czy genami”. Co Doktorantka ma na myśli pisząc o interakcjach między genami? Czy produkty ich ekspresji?
- strona 25: Doktorantka używa skrótów nazw gatunkowych *P. pyralis*, *P. plagiophtalamus*, *R. reniformis*, *G. princeps*. Wcześniej nie używano nazw





rodzajowych, a więc proponowałabym zastosowanie nazewnictwa w postaci *Photinus pyralis*, *Pyrophorus plagiophtalamus*, *Renilla reniformis* i *Gaussia princeps*.

- Strona 37: Co Doktorantka rozumie pod pojęciem „złożenia łańcucha polipeptydowego”? Czy chodzi o proces fałdowania, zwinięcie przestrzenne polipeptydu?
- strona 53: Doktorantka używa słowa opłaszczanie w stosunku do procesu przylegania komórek do powierzchni płytki 96-dołkowej. Termin ten stosuje się raczej do białek lub innych cząsteczek, a nie do komórek.
- Strona 55: wydaje mi się, że zamieniono ilość wysianych komórek na płytkach 24- i 48-dołkowych
- Strona 62: Podpis pod Rysunkiem 9 wskazuje, że lewa kolumna przedstawia obrazy mikroskopowe poszczególnych linii komórkowych. O jaką lewą kolumnę chodzi?
- strona 93: Podpisy pod Rysunkiem 23 i 24 są identyczne, a z opisu w tekście rozdziału wynika, że przedstawiają inne stężenie DSSN+
- strona 99: Analizując obrazy mikroskopowe przedstawione na Rysunkach 28 i 29 oraz porównując je ze zdjęciami na poprzednich stronach, a w szczególności biorąc pod uwagę dość duże pole widzenia, mam wątpliwość czy rzeczywiście przedstawione zdjęcia pokazują powiększenie 40x. Sugerowałabym także, aby przy analizach porównawczych stosować takie same powiększenia.

Powyższe uwagi, w części dotyczące pomyłek edytorskich i gramatycznych mają na celu jedynie korektę pracy. Natomiast pod względem merytorycznym przedstawioną do recenzji dysertację oceniam bardzo wysoko. Cele zostały jasno określone, cykl eksperymentalny dobrze przemyślany, a Doktorantka wykazała się znajomością różnych technik badawczych. Dlatego stwierdzam, że praca doktorska mgr Justyny Milczarek spełnia wszystkie wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (art. 13 z dnia 14 marca 2003 r. Dz. U. nr 65, poz. 593 z późniejszymi zmianami), stawiane rozprawom doktorskim. Z pełnym przekonaniem wnioskuję więc do Rady Naukowej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Justyny Milczarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję by wyróżnić recenzowaną pracę doktorską z uwagi na jej wysoką wartość naukową i praktyczną potwierdzoną publikacjami o zasięgu międzynarodowym oraz znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy.

*Edyta Gembalska-Dammach*

