



UNIwersytet  
IM. ADAMA MICKIEWICZA  
W POZNANIU

Prof. dr hab. Adam Huczyński  
Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
e-mail: [adam.huczynski@amu.edu.pl](mailto:adam.huczynski@amu.edu.pl)  
<https://adhucz.home.amu.edu.pl/>

Poznań 25-11-2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominika Terefinko  
„Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej oraz we współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk również we Wrocławiu. Z tego też powodu doktorat ma dwóch promotorów: dr hab. inż. Piotra Jamróza, prof. PWR (ze strony PWR) oraz prof. dr hab. Aleksandrę Klimczak (ze strony IITD PAN).

Rozprawa doktorska jest wyjątkowo interdyscyplinarna, gdyż Doktorant podjął się rozwiązania ciekawego i nowatorskiego problemu naukowego polegającego na zbadaniu bezpośredniego i pośredniego wpływu zimnych plazm atmosferycznych na aktywność biologiczną komórek raka piersi oraz zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do wywołania zmian aktywności biologicznej wybranych antybiotyków.

Zadania badawcze wymagały wielu bardzo zaawansowanych umiejętności technicznych z zakresu konstrukcji układów wyładowczych zimnych plazm (pióro plazmowe i szczotka plazmowa) do badań ich oddziaływania na pożywki hodowlane, komórki nowotworowe oraz wodne roztwory antybiotyków. Badania naukowe oparte były w dużej mierze na znanych metodach wyznaczania wpływu czynników na proliferację komórek nowotworowych, takich jak: test MTT obrazujący aktywność metaboliczną komórek, testy polegające na barwieniu aneksyną V i jodkiem propidyny do obrazowania apoptozy komórek, test zarysowania stosowany do badania zdolności migracji komórek. Dodatkowo w doktoracie opisano metodologię badań i ich wyniki dotyczące analizy jakościowej i ilościowej reaktywnych form tlenu i azotu w fazie gazowej i ciekłej, zastosowania metod

chromatograficznych opisu zjawisk, którym ulegają antybiotyki traktowane zimną plazmą atmosferyczną.

Doktoranta interesowała również analiza dystrybucji przestrzennej reaktywnych form tlenu. Tak szerokie spektrum zainteresowań naukowych, metodologii badań i wyników, które należy umiejętnie zinterpretować, już w tym momencie pozwalają wyrazić **podziw dla nakładu pracy Doktoranta i jego kompetencji naukowych.**

Efektom opisanych prac są wieloautorskie prace czy patenty. Ta oczywista wieloautorskość jest rzeczą normalną we współczesnej nauce, jednak recenzent doktoratu powinienem mieć pewność, który fragment rozprawy (badań naukowych) był samodzielnie wykonywany przez Doktoranta, a które wyniki badań pochodzą ze współpracy z innymi naukowcami. Rycina 4 zatytułowana „*Chronologiczne przedstawienie etapów realizacji poszczególnych celów badawczych mających na celu przeprowadzenie pośredniego zastosowania układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi*” prezentuje miejsce akcji, ale nie głównych aktorów. **To nie budynki, sprzęt i Wydziały prowadzą badania, ale ludzie. Mam zatem prośbę, aby przy swojej prezentacji na obronie Doktorant dokonał prezentacji wkładu własnej pracy i skomentował odpowiedni wkład pracy współpracowników** (innymi słowy, *Author Contributions* byłby mile widziany).

Układ doktoratu jest typowy dla eksperymentalnych prac doktorskich. Jest to obszerna, 200 stronicowa praca. Badania własne poprzedza dobrze napisany wstęp opisujący stan wiedzy (bardzo aktualne cytowania literatury) potrzebny do zrozumienia kontekstu tej pracy. Początkowo, przyznać to muszę, uważałem, że wstęp teoretyczny tej pracy doktorskiej jest zbyt obszerny, ale kiedy już przez niego przebrnąłem, to zmieniłem zdanie. Dzięki lekturze tak obszernego opisu badań innych naukowców w dziedzinie zastosowań zimnych plazm w badaniach biologicznych, mogłem przystępować z większą swobodą do recenzji badawczej części doktoratu. Materiał zaprezentowany w części teoretycznej został opublikowany w artykule przeglądowym: Terefinko D., Dzimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. „*Biological Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma on Skin Cancer*” **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, 2021, 41, 507-529 (IF=2,990, P<sub>MNISW</sub>=100.)



Część badawcza doktoratu zawiera opis metodologii przeprowadzonych badań własnych z wykorzystaniem zimnej plazmy, badań biologicznych i chemicznych, rezultatów tych badań oraz analizę uzyskanych wyników. Ciekawym podejściem w części badań własnych jest niewątpliwie zawarcie hipotez badawczych, które stawia Autor na początku każdego z trzech wyszczególnionych zadań badawczych. Jako zadania badawcze Autor wybrał:

1. Pośrednie zastosowanie układu zimnej plazmy atmosferycznej do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi;
2. Bezpośrednie i mieszane zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do zahamowania aktywności biologicznej komórek raka piersi;
3. Bezpośrednie zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków.

Badania w punktach 1 i 2 mają dość podobną metodologię badawczą i obiekt badań (komórki nowotworowe), zatem pozwolę sobie zrecenzować je razem. Są ponadto połączone z sobą logicznym następstwem.

W pierwszym zadaniu autor dowiódł, iż pożywki hodowlane stosowane w eksperymentach *in vitro*, które poddano wstępnie działaniu zimnych plazm, akumulowały w sobie reaktywne formy tlenu i azotu (w szczególności jony  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{NO}_3^-$  oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), co w następstwie prowadziło do spadku żywotności hodowanych na nich komórek nowotworowych MCF-7 (słabo przerzutująca linia nowotworu piersi) i MDA-MB-231 (linia agresywnego nowotworu piersi o wysokiej zdolności przerzutowania), jak również obniżenia ich mobilności. Dodatkowo badania Doktoranta pokazały ciekawą selektywność wpływu zimnych plazm na pożywki hodowlane, gdyż ich wstępne oddziaływanie na pożywkę wywoływało wtórnie zaburzenia procesów życiowych komórek nowotworowych (apoptozę), a nie wpływało znacząco na żywotność komórek normalnych, których modelem był MCF-10A (unieśmiertelnione komórki nabłonkowe piersi). Selektywność tego oddziaływania na komórki nowotworowe pożywek, poddanych wstępnie działaniu zimnych plazm, Autor starał się tłumaczyć różnicami w budowie błony komórek nowotworowych (m.in. podwyższoną zawartością frakcji cholesterolowych w błonie komórkowej komórek nowotworowych, która sprzyja akumulacji m.in.  $\text{H}_2\text{O}_2$  prowadząc do stresu oksydacyjnego w komórce). O ile w pierwszym zdaniu pióro plazmowe zostało wykorzystane do wstępnego oddziaływania na pożywkę hodowlane DMEM i Opti-MEM, które następnie użyto do pośredniego traktowania

wspomnianych komórek raka piersi podczas hodowli, tak w drugim zadaniu wspomniane komórki poddano bezpośredniej ekspozycji na źródło zimnej plazmy oraz traktowaniu mieszanemu, polegającemu na potraktowaniu zimną plazmą zarówno komórek jak i podłoża, na którym je hodowano. Tak skonstruowany koncept badań pozwolił na zauważenie wielu ciekawych i nieoczywistych korelacji, które stanowią cenny wkład do wiedzy o wpływie zimnych plazm na aktywność biologiczną *in vitro* wybranych modeli komórkowych nowotworów. Otrzymane rezultaty to korelacja bardzo wielu zmiennych i dlatego z nieukrywanym podziwem mogę stwierdzić, że Autor chciał odnaleźć jak najwięcej możliwych zależności, współzależności czy wpływów na uzyskane rezultaty. Praca na wielu zmiennych może doprowadzić zawsze do błędnej interpretacji. Aby uniknąć błędów w interpretacji, Doktorant badał aktywność biologiczną komórek, w tym m.in.

- wpływ rodzaju pożywki DMEM lub Opti-MEM,
- wpływ dodatku FBS (ang. *Fetal Bovine Serum* - surowica płodowa cieląt) dodanej do pożywki przed i po zastosowaniu zimnej plazmy,
- wpływu pośredniego, bezpośredniego i mieszanego traktowania komórek raka piersi zimną plazmą na aktywność metaboliczną komórek, ich zdolności migracji czy uleganiu apoptozie.

Jednym z najważniejszych wniosków wynikających z badań mgr inż. Dominika Terefinko było dowiedzenie zwiększonej podatności komórek linii agresywnego nowotworu piersi MDA-MB-231 na działanie bezpośrednie, pośrednie i mieszane źródłem zimnej plazmy atmosferycznej.

W mojej opinii z tak złożonym problemem naukowym opisanym w zadaniach 1 i 2 Doktorant poradził sobie sprawnie, a obserwacje (choć nie do końca wnioski), które poczynił są wartościowe. Potwierdzeniem mojej opinii może być również opublikowanie wyników rezultatów badań z zadania 1 i 2 w renomowanym czasopiśmie z listy JCR: Terefinko D., Dżimitrowicz A.P., Bielawska-Pohl, A., Klimczak A., Pohl P., Jamroz P. *"The influence of cold atmospheric pressure plasma-treated media on cell viability, motility, and induction of apoptosis in human non-metastatic (MCF7) and metastatic (MDA-MB-231) breast cancer cell lines."* **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 22, s. 1-23. IF=5.924, MEiN =140



Niemniej, jako że jestem chemikiem medycznym, którego narzędziem pracy jest synteza organiczna, nasunęły się ważne aspekty, które niestety zarówno w przeprowadzonych pomiarach, jak i w dyskusji zostały przez Autora pominięte. W tym miejscu proszę zatem o udzielenie odpowiedzi na tylko najbardziej nurtujące mnie kwestie.

**Pytania wymagające wyjaśnienia, dotyczące metodologii badań naukowych:**

1. Do pożywek hodowlanych dodawano antybiotyki  $100 \text{ U/cm}^3$  roztworu penicyliny i  $100 \mu\text{g/cm}^3$  streptomycyny. Jednocześnie w zadaniu 3 wykazano „zanik” antybiotyków po traktowaniu zimną plazmą. W związku z tym mam pytanie czy badano poziom wspomnianych antybiotyków w pożywce (udowodniono, że jeszcze są tam obecne i zabezpieczają próbkę przed zakażeniem) oraz czy „potencjalny” lub rzeczywisty ich ubytek mógł wpłynąć na wynik pomiaru?
2. Czy obniżenie żywotności komórek nowotworowych hodowanych na pożywkach traktowanych zimną plazmą nie może być związane z przemianami chemicznymi w tej pożywce, polegającymi nie tylko na akumulacji RFT i RFA, i ich wpływowi na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach, ale również na ubytek, rozkład i przemiany chemiczne składników odżywczych w tych pożywkach? Czy dokonano pomiaru składu pożywki po traktowaniu zimną plazmą, wykluczając zmianę optymalnych stężeń składników pokarmowych i ich niekorzystnych przemian? Czy wykluczono wpływ niedostatków składników odżywczych na cykl komórkowy komórek nowotworowych? Czy zidentyfikowane przez Autora wysoko energetyczne reaktywne formy tlenu (w szczególności  $\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , rodniki hydroksylowe  $\text{OH}^\bullet$ ) o relatywnie krótkim czasie życia, poprzez oddziaływanie ze składnikami pożywki, prowadzą do wytwarzania organicznych związków reaktywnych o relatywnie długim czasie życia i znanej toksyczności (takich jak: nadtlenki organiczne, *N*-tlenki, związki nitrozowe oraz peroksokwasy)?

Po wyrażeniu ciekawości dotyczącej badań opisanych przez Doktoranta w zadaniach badawczych 1 i 2 chciałbym przejść do omówienia wyników i ich interpretacji, które Doktorant realizował w zadaniu 3: „Bezpośrednie zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych do obniżenia aktywności biologicznej wodnych roztworów antybiotyków”.

Tematycznie to zadanie badawcze odbiega nieco od poprzednich dwóch, ale spajającym elementem jest zastosowanie układów zimnych plazm atmosferycznych.

Celem jaki Doktorant postawił sobie było wykorzystanie własnego układu wyładowczego do degradacji antybiotyków, tj. ofloksacyny (OFX), doksycykliny (DXC), ampicyliny (AMP), chloroamfenikolu (ChRP), w wodzie i zbadanie efektywności tego procesu. Uzyskane po zastosowaniu zimnej plazmy roztwory (w doktoracie nie pokazano, co zawierają) zostały zbadane pod względem aktywności wobec bakterii z grupy Gram (-) i Gram(+) tj., *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* i *Enterobacter cloacae*.

Wodne roztwory antybiotyków zostały poddane działaniu z wykorzystaniem autorskiego układu reakcyjno-wyładowczego, gdzie końcowym jego elementem generującym zjonizowany gaz wyładowczy w postaci stożka zimnej plazmy, było pióro plazmowe lub szczotka plazmowa (o wiele bardziej wydajny układ).

Moje największe zastrzeżenia budzi fakt zupełnego braku profesjonalnych wyników z użyciem technik badawczych HPLC-DAD i UPLC-MS/MS, które posłużyłyby Autorowi **tylko do określenia wydajności rozkładu i porównania ich z wynikami uzyskanymi dla roztworów antybiotyków, a powinny zostać również wykorzystane do określenia co pozostało w roztworze**. W doktoracie pokazano zaledwie Rycinę 21 pt. „Uzyskane chromatogramy (przy długości fali 254 nm) z wykorzystaniem techniki HPLC-DAD dla roztworów mieszanin M35 i M10 poddanych traktowaniu szczotką plazmową operowaną w warunkach optymalnych”.

Takie podejście do problemu naukowego, w którym zaplanowano tyle innych różnorodnych i cennych pomiarów bardzo mnie zdziwiło. Uważam takiego rodzaju podejście polegające na **braku kluczowych analiz charakteryzujących mieszaninę poreakacją, za największe niedopatrzenie tej rozprawy doktorskiej**. Trochę nie mogąc uwierzyć, że tak znakomity naukowiec, jakim jest niewątpliwie mgr inż. Dominik Terefinko, w tak dobrym zespole badawczym, odpuścił sobie próbę oznaczenia składu mieszaniny poreakcyjnej. Z tego powodu poszukałem czy może w jego najnowszych publikacjach jest odpowiedź na nurtujące recenzenta pytanie. I jakie było moje zdziwienie, gdy w najnowszej publikacji: Terefinko, D., et al. „*Removal of clinically significant antibiotics from aqueous solutions by applying unique high-throughput continuous-flow plasma pencil and plasma brush systems*”, która ukazała się w niezwykle prestiżowym **Chemical Engineering Journal** 2023, 452, 139415, znalazłem dokładnie to, co powinno być omówione w recenzowanym doktoracie.

Nie wiem dlaczego Autor, mając dostęp do tych danych, nie użył ich lub chociaż nie przeprowadził dyskusji o tym, co dzieje się z antybiotykami po traktowaniu ich zimną plazmą. Z opisu zamieszczonego w rozprawie doktorskiej, a na nim recenzent musi bazować, wynika,



iż Doktorantowi udało się potwierdzić to, co znane było już wcześniej w literaturze; że właściwie dobrany układ do generowania zimnej plazmy może skutecznie zmniejszać stężenie wybranych związków organicznych (tutaj: wybranych antybiotyków) w ich roztworach oraz iż efektywność tego procesu była lepsza przy użyciu szczotki plazmowej i wiązała się z wytwarzaniem RFT i RFA tj.  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$  i  $\text{OH}^\bullet$ . Widoczną redukcję aktywności bakteriobójczej roztworów antybiotyków poddanych działaniu układów do generowania zimnej plazmy wiązać można jednoznacznie ze zmniejszeniem stężenia antybiotyku w roztworze.

Zdolność zaprojektowanego układu z użyciem szczotki plazmowej do wywoływania degradacji antybiotyków zaowocowała zgłoszeniem patentowym pt. *„Sposób rozkładu antybiotyków z roztworów wodnych z zastosowaniem zimnej plazmy atmosferycznej, generowanej w przepływowej szczotce plazmowej oraz szczotka plazmowa do realizacji tego sposobu” (P.441085)* oraz międzynarodowym zgłoszenia w trybie PCT pt. *„Method of degrading antibiotics from aqueous solutions by using cold atmospheric pressure plasma generated in a flowing plasma brush and a plasma brush intended for this method.” PCT/PL2022/050027*. Przedstawione badania są też podstawą wspomnianej publikacji zaakceptowanej 21 września 2022 roku (**Chemical Engineering**, 452, 4, 15 January 2023, 139415).

### **Podsumowanie**

Oceniany doktorat jest wynikiem wyjątkowo zawansowanych, trudnych, żmudnych i wielokrotnie powtarzanych eksperymentów, łączących wiedzę biologiczną, biochemiczną i wiedzą o układach do generowania zimnej plazmy. W doktoracie mamy do czynienia ze stawieniem pytań nowych oraz znanych już w literaturze, choć postawionych inaczej; dla innych układów, innych linii komórkowych i przede wszystkim **dla własnych układów do generowania zimnej plazmy**. Doktorat jest napisany w przystępny sposób, pomimo bardzo zawansowanych problemów naukowych, które były badane i zostały opisane. Z podziwem czytałem skrupulatne opisy metodologii pomiarowych, dokładnych, rzetelnych i powtarzalnych. Poza skomplikowanymi pomiarami Doktorant poradził sobie doskonale z wyciąganiem wniosków z wielu zmiennych, z optymalizacją wieloparametrową układów badawczych, ze statystycznym podejściem do wyników pomiarów. Bogata wiedza na temat opisywanych zjawisk przełożyła się na doskonałe publikacje i patenty.

W tym miejscu przechodzę do najważniejszej konkluzji o tym, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska przedstawia rozwiązania niezwykle złożonych problemów badawczych. Wartościowy wkład tej rozprawy spełnia zarówno wymogi formalne jak i zwyczajowe, które stawiane są przed tego rodzaju pracami przez odpowiednią Ustawę (w trybie przewidzianym w art. 179 ust. 7 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.). W związku z tym z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej wnioski o dopuszczenie mgr inż. Dominika Terefinko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Kierownik  
Zakładu Chemii Medycznej  
  
prof. dr hab. Adam Huczyński