



21.11.2022 r.

Prof. dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz
Samodzielna Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Dominika Terefinko pt. „Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej” wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Piotra Jamroza, prof. PWr oraz prof. dr hab. Aleksandry Klimczak

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pod tytułem „Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej” koncentruje się wokół dwóch głównych celów badawczych: (1) optymalizacji parametrów wzbudzania zimnej plazmy atmosferycznej w celu uzyskania jak największej aktywności przeciwnowotworowej w stosunku do komórek raka piersi oraz (2) przeprowadzeniu wieloczynnikowej optymalizacji parametrów operacyjnych a także modyfikacji konstrukcyjnych układu wyładowczego w celu uzyskania jak największej efektywności degradacji antybiotyków w roztworach wodnych.

Rozprawa doktorska liczy 190 stron (nie licząc życiorysu naukowego), a jej układ nie jest typowy dla pracy badawczej. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska w niektórych fragmentach przypomina autoreferat pisany w pierwszej osobie, w którym Doktorant podkreśla swoje osiągnięcia naukowe w tej tematyce badawczej, uzyskane wcześniej wyniki badań oraz udział w projektach naukowych. Ponieważ układ pracy jest dość nietypowy, momentami praca jest trudna w odbiorze, zwłaszcza biorąc pod uwagę tak dużą złożoność wykonanych badań. Praca doktorska jest uzupełniona o wykaz stosowanych skrótów (choćby sugerowałabym zrobić wykaz alfabetyczny, co byłoby bardziej praktyczne dla czytelnika), listę Tabel i Rycin, plany na przyszłość, życiorys naukowy Doktoranta oraz streszczenie w języku polskim i angielskim, co jest wymagane stosowną ustawą.

Temat podjęty przez Doktoranta wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu terapii nowotworów oraz zanieczyszczenia środowiska antybiotykami, co przekłada się na wielolekooporność bakterii. W ramach prowadzonych badań, Doktorant wyznaczył sobie trzy główne zadania badawcze, które omówił jako oddzielne zagadnienia wraz



interpretacją oraz dyskusją uzyskanych wyników. Pierwsze zadanie koncentrowało się na pośrednim wykorzystaniu technologii zimnej plazmy w terapii nowotworów. W tym celu Doktorant wykorzystał dwie różne pożywki hodowlane, które następnie były poddane aktywacji zimną plazmą stosując różne czasy ekspozycji. Aktywność przeciwnowotworowa tak zaktywowanych pożywek hodowlanych została sprawdzona w stosunku do dwóch nowotworowych linii raka piersi. W tym celu dokonano analizy żywotności, migracji komórek oraz apoptozy i nekrozy. Równolegle wykonano badania na nienowotworowych komórkach wyizolowanych z tkanki nabłonkowej piersi, dzięki czemu uzyskane wyniki mają jeszcze większą wartość naukową i poznawczą. Dodatkowo Doktorant wykonał pomiary kolorymetryczne w celu oznaczenia stężeń reaktywnych form tlenu i azotu w zaktywowanych pożywkach hodowlanych oraz zbadał przestrzenną dystrybucję reaktywnych form tlenu po aktywacji plazmą.

W następnym etapie badań, Doktorant dokonał oceny aktywności przeciwnowotworowej zimnej plazmy na skutek bezpośredniego oddziaływania z komórkami oraz z wykorzystaniem układu mieszanego, czyli poprzez bezpośrednie traktowanie komórek źródłem zimnej plazmy, a następnie wystawienie ich na działanie pożywki hodowlanej aktywowanej zimną plazmą. Podobnie jak w przypadku zadania pierwszego, działanie przeciwnowotworowe zostało określone poprzez ocenę żywotności, migracji komórek oraz apoptozy i nekrozy.

W ostatnim etapie badań, Doktorant zmienił obszar badawczy i skoncentrował się na ocenie degradacji wybranych antybiotyków i utraty ich aktywności biologicznej pod wpływem działania zimnej plazmy. W tym celu wykorzystał dwa układy wyładowcze zimnych plazm – pióro plazmowe i szczotkę plazmową. Efektywność degradacji antybiotyków została sprawdzona stosując dwie metody analityczne: UPLC-MS oraz HPLC-DAD. Natomiast utrata aktywności bakteriobójczej antybiotyków po działaniu plazmy została potwierdzona z wykorzystaniem czterech szczepów bakteryjnych za pomocą testu dyfuzyjno-krażkowego.

Rozprawa doktorska mgr Dominika Terefinko została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Mimo że momentami trudna w odbiorze, praca jest przejrzysta, a cele badawcze zostały bardzo dobrze sformułowane. Wstęp jest obszerny, interesujący oraz zawiera wszystkie potrzebne informacje, które są niezbędne dla zrozumienia podjętej tematyki badawczej. Doktorant wzbogacił wstęp w liczne tabele podsumowujące osiągnięcia



innych naukowców w tej tematyce badawczej. Bez wątplenia tak dobrze napisany wstęp stanowi doskonałe kompendium wiedzy i może stanowić podstawę do napisania wyczerpującej ten temat pracy przeglądowej, do czego gorąco zachęcam Doktoranta. Jeśli chodzi o część eksperymentalną, to na pochwałę zasługuje bez wątplenia ilość, złożoność i interdyscyplinarność wykonanych badań. Mgr Dominik Terefinko zastosował bardzo podstawowe, aczkolwiek właściwie metody badawcze typowe dla oceny aktywności przeciwnowotworowej. Chciałabym również zwrócić uwagę na bardzo dobrze napisaną interpretację i dyskusję wyników, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Niemniej jednak w dyskusji wyników zabrakło korelacji analizy stężeń reaktywnych form tlenu i azotu w pożywkach hodowlanych z uzyskanymi wynikami w testach komórkowych, co jest drobnym niedociągnięciem. W tym miejscu z obowiązku Recenzenta chciałabym również prosić Doktoranta o odpowiedź na kilka pytań oraz ustosunkowanie się do pewnych uwag:

- (1) Skład pożywki poddawanej aktywacji plazmą: skoro reaktywne formy tlenu mogą inaktywować działanie antybiotyków, to dodawanie przez Doktoranta streptomycyny i penicyliny do pożywek hodowlanych przed plazmowaniem zdaje się być nieuzasadnione.
- (2) Metodyka: w opisie metodyki brakuje pewnych szczegółów, np. jaki był czas ekspozycji pożywki na działanie plazmy. Te informacje pojawiają się dopiero przy omawianiu wyników. W niektórych fragmentach opisu metodyki Doktorant używa pierwszej osoby, co jest nierekomendowane przy pisaniu prac badawczych. Ponadto powszechnie stosuje się zasadę, że kolejność opisywanych metod odpowiada kolejności opisywanych wyników. Podczas gdy Doktorant w opisie metodyki na samym końcu umieścił analizę dystrybucji reaktywnych form tlenu, a wyniki z tego eksperymentu w sekcji „Wyniki i dyskusja” są omawiane na samym początku.
- (3) Test rysy: Doktorant używa określenia „test zarysowania”, co jest bardzo mylące. Prawidłowa nomenklatura to „test zarastania rysy” lub „test rysy”. Określenie „test zarysowania” jest zarezerwowane w inżynierii materiałowej do badań mających na celu ocenę adhezji/przyczepności powłok do podłoża/materiału. Test zarastania rysy jest prostym i dobrym narzędziem do wstępnej oceny migracji komórek. Niemniej jednak aby uzyskać wiarygodne wyniki badań, zalecane jest dodawanie do pożywki hodowlanej inhibitorów mitozy (np. mitomycyny C) jeśli ocena migracji komórek wykonywana jest po czasie dłuższym niż 24 godziny. Doktorant dokonywał oceny migracji maksymalnie



po 24-30 godzinach, więc brak inhibitora mitozy nie jest dużym błędem. Aczkolwiek warto wziąć ten aspekt pod uwagę w przyszłych badaniach, ponieważ obserwowana migracja komórek (tym samym zarastanie rasy) może być wynikiem podziałów komórkowych oraz zwiększania się liczby komórek w populacji, a nie zdolności motorycznych komórek.

- (4) Przedstawienie wyników na Rycinie 8: nie jest dla mnie do końca zrozumiałe dlaczego Doktorant pokazał wyniki testu MTT dla czasu 0 dni tylko w przypadku Ryc.8i. Na pozostałych wykresach jest przedstawiony wyłącznie czas 1 oraz 2 dni. Ponadto z opisu metodyki wynika, że czas „0 dni” oznaczał moment kiedy komórki nie były jeszcze poddane działaniu aktywowanej plazmą pożywki. W takim razie jak Doktorant wytłumaczył tak duży spadek żywotności komórek linii MCF-7 z grupy V_240s w czasie 0 dni zaobserwowany na Ryc. 8i?
- (5) Test MTT w Zadaniu II: dlaczego w Zadaniu I test MTT był wykonywany maksymalnie po 2 dniach ekspozycji komórek na działanie aktywowanej plazmą pożywki, natomiast w Zadaniu II test ten wykonano aż po 7 dniach? Test MTT służy zarówno ocenie cytotoksyczności, jak i proliferacji komórek. Istnieje subtelna aczkolwiek zasadnicza różnica między testem cytotoksyczności a testem proliferacji. Z opisu metodyki wynika, że Doktorant oceniał przede wszystkim żywotność komórek i wykonywał test cytotoksyczności. Test proliferacji, w przeciwieństwie do testu cytotoksyczności, wykonuje się po długoterminowej hodowli komórek (minimum 3 dniowej). Ponadto w celu oceny proliferacji komórek, wysiewa się niedużą gęstość komórek, aby te nie weszły zbyt szybko w fazę stacjonarną. Zatem 7 dniowa hodowla komórek w Zadaniu II, wysianych w stosunkowo dużej gęstości zdaje się być nieuzasadniona. Ma to odzwierciedlenie w otrzymanych wynikach, ponieważ w niektórych przypadkach wartości OD dla komórek kontrolnych w 7 dniu hodowli są niższe niż wartości OD w 4 dniu, co świadczy o tym, że populacja komórek weszła w fazę stacjonarną i zaczęła już obumierać, fałszując nieco wyniki badań. Co więcej, zastosowanie tych samych warunków doświadczalnych przy ocenie cytotoksyczności w Zadaniu I oraz II, pozwoliłoby Doktorantowi porównać efekt przeciwnowotworowy dla trzech różnych układów (pośredniego, bezpośredniego i mieszanego), co miało by dużą wartość poznawczą.



- (6) Poddanie komórek działaniu plazmy w Zadaniu II: skoro celem tego eksperymentu było zbadanie aktywności przeciwnowotworowej w wyniku bezpośredniego działania plazmy na komórki, to dlaczego test został wykonany z wykorzystaniem zawiesiny komórek w PBS? Czy Doktorant nie rozważał aby hodować komórki bezpośrednio w płytce polistyrenowej, zlać pożywkę hodowlaną, przepłukać komórki PBS, a następnie zadziałać zimną plazmą bezpośrednio na monolayer komórek (bez PBS). Podczas tak krótkiej ekspozycji (30, 45, 60s) na działanie plazmy, komórki nie obumarłyby bez płynnego podłoża. Skoro komórki były zawieszane w PBS, to czy nie było ryzyka, że PBS może być źródłem reaktywnych form tlenu i azotu po zadziałaniu plazmy? Czy Doktorant wykonał analizę ilości reaktywnych form tlenu i azotu w PBS po zadziałaniu plazmą?

Chciałabym podkreślić, że powyższe uwagi krytyczne, które wskazałam z obowiązku Recenzenta, są tak naprawdę tylko drobnymi niedociągnięciami, wśród których nie ma żadnego poważnego zarzutu merytorycznego. Rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Dominika Terefinko prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny i naukowy. W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Dominik Terefinko zrealizował w pełni założone cele badawcze przy użyciu różnych metod analitycznych, biochemicznych, modeli komórkowych *in vitro* oraz testów mikrobiologicznych. Przedstawione badania mają bez wątpienia charakter interdyscyplinarny i wymagały od Doktoranta umiejętności podjęcia współpracy z naukowcami z różnych dziedzin nauki. Z pewnością wykonanie tak złożonych eksperymentów oraz interpretacja otrzymanych wyników, wymagała od Pana Dominika Terefinko ciągłego doszkalania się, ogromnej wiedzy i dużego zaangażowania.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Dominika Terefinko pt. „Zbadanie aktywności biologicznej różnych układów zimnej plazmy atmosferycznej” jest bardzo wartościowym dziełem z zakresu badań nad wykorzystaniem technologii zimnej plazmy w terapii przeciwnowotworowej oraz w ograniczaniu lekooporności bakterii wynikającej z zanieczyszczenia środowiska antybiotykami. Warto również podkreślić aktywność naukową mgr Dominika Terefinko, który pełnił rolę wykonawcy w sześciu prestiżowych projektach naukowych finansowanych m.in. przez Narodowe Centrum Nauki. Co więcej mgr Dominik Terefinko może pochwalić się znaczącym dorobkiem naukowym. Jest współautorem w 11 artykułach opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku $IF = 51,096$, 1 patentu krajowego oraz 4 zgłoszeń



patentowych. W związku z tym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona przez mgr Dominika Terefinko rozprawa doktorska spełnia wymagania zapisane w stosownej ustawie (Art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce), stanowiąc znaczny wkład w dziedzinę nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne. **Biorąc pod uwagę powyższe oraz uwzględniając bardzo wysoką ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej, jak również rangę rozwiązywanego problemu badawczego, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Dominika Terefinko oraz o dopuszczenie Go do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni
Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
A. Przekora - Kuśmierz
prof. dr hab. Agata Przekora-Kuśmierz