



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Dr hab. Beata Krasnodębska-Ostręga  
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego  
Pracownia Chromatografii i Analityki Środowiska  
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa  
Tel: (22) 5526375, Fax: (22) 5526434  
bekras@chem.uw.edu.pl

6 listopada 2019 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak**

*"Przemiany cytotoksycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas"*

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak została złożona w postaci książki wydanej przez Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej. Praca ta została wykonana i opisana pod kierunkiem Pani dr inż. hab. Katarzyny Pawlak prof. ucz. z Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Badania zostały sfinansowane ze środków projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (2013/09/ST4/00961) pt. „Opracowanie metod badania zaburzeń równowagi jonowej i ich genezy w komórkach rakowych poddanych działaniu cytostatyków”. Kierownikiem grantu był promotor ocenianej rozprawy doktorskiej.

Zgodnie z danymi załączonymi do rozprawy Doktorantka jest współautorem 4 wieloautorskich publikacji naukowych, w tym 1. o charakterze przeglądowym i 1. pracy oryginalna w języku angielskim oraz 2. publikacji w języku polskim, tj. branżowej recenzowanej i rozdziału w monografii. Dorobek nie jest imponujący, ale jest to ściśle związane ze złożeniem w 2016 roku wniosku patentowego. Jestem przekonana, że już powstają lub są przygotowane do wysłania prace o opisanych w rozprawie wynikach. Pani mgr inż. Jakubczak jest współautorem szeregu wystąpień konferencyjnych: 17. o charakterze komunikatu ustnego, w tym 7. na konferencjach międzynarodowych oraz 14. w formie plakatu, w tym 8. na konferencjach międzynarodowych. Niestety Doktorantka nie wskazała, które wystąpienia były prezentowane przez nią samodzielnie. Należy podkreślić, że mgr inż. Wioletta Jakubczak jest współautorem zgłoszenia patentowego z roku 2016. Odbyła także 3-miesięczne praktyki zawodowe w ramach projektu Erasmus plus.



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



Tematyka badawcza recenzowanej rozprawy doktorskiej mieści się doskonale w nurcie publikacji naukowych związanych z oceną wpływu leków przeciwnowotworowych, w tym przypadku opartych na kompleksach złota i platyny. Leki te nie są obojętne i wywołują zaburzenia w komórkach nie zawsze pożądane. Praca ta dotyczy bardzo szeroko nakreślonych i wykonanych badań związanych z oznaczaniem różnych form fizycznych i chemicznych połączeń Au i Pt, rozróżniano wielkość, mobilność i stopień hydrofobowości. Wykorzystanie połączenia technik rozdzielania związków chemicznych i detekcji z zastosowaniem spektrometrii mas doprowadziło do ciekawych wyników i ważnych analitycznie modyfikacji procedur, włącznie z zaproponowaniem rozwiązania innowacyjnego technicznie dozowania bardzo małych objętości próbki do układu pomiarowego (wniosek patentowy). Wymagało to szerokich badań z zakresu optymalizacji warunków rozdzielania i detekcji w poszczególnych pomiarach. Dodatkowo udało się Doktorantce zaproponować ciekawą acz prostą metodę normalizacji zawartości Au i Pt względem ilości komórek, tak aby dało się porównywać zaburzenia wywołane lekami, niezależnie od gęstości komórkowej. Autorka wyprowadzając wnioski oparła się na własnych eksperymentach, jak i wynikach powiązanych z badaniami dr Mai Haczyk-Więcek z Katedry Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Powiązanie badań Pani Jakubczak z badaniami Doktor Haczyk-Więcek dało ciekawe informacje dotyczące zmian w zakresie żywotności komórek, ich morfologii po podaniu do hodowli auranofiny lub cisplatyny. Leki te były porównywane w ramach biologicznych i chemicznych eksperymentów prowadzonych na tkankach nowotworowych i zdrowych.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest napisana w układzie maszynopisu w formie książki wydanej przez Politechnikę Warszawską. Co oczywiście ustawa o stopniach i tytułach naukowych dopuszcza w artykule 13 punkcie 2. Na recenzowaną pracę składa się 118 stron tekstu i graficznych ilustracji (rysunki, zdjęcia, grafy, obrazy mikroskopowe). Szata graficzna jest estetyczna. Praca podzielona została na szereg części. Na początku chciałam podkreślić, że praca zawiera sporo graficznych ilustracji i tabel z nazwami związków i technik badawczych oraz rozbudowany wykaz stosowanych skrótów (4 strony).



Omawiać w mojej recenzji będę poszczególne rozdziały w sekwencji tożsamej z ich pojawiania się w tekście.

Autorka w części nazwanej Streszczenie bardzo zwięźle przedstawiła wyciągnięte wnioski. Jednak Cel Pracy jest sformułowany wręcz bardzo zwięźle. Szkoda, że nie pokazano sformułowanych też badawczych i postawionych pośrednich celi eksperymentalnych wiodących do pozyskania wiedzy „ jak zaburzana jest równowaga jonowa w komórkach... w skutek obecności kompleksów metali.... oraz ich przemian metabolicznych”. Autorka zajęła się fragmentem *jonomiki*, czyli oznaczania wybranych jonów, a nie składu pierwiastkowego danej komórki. Kolejny podrozdział Części Literaturowej to Wprowadzenie. Wstęp ten można nazwać wstępem medycznym, gdzie Doktorantka pokazała się, jako bardzo dobry analityk, który musi rozumieć potrzeby i problemy, jakie napotka podczas pracy nad częścią analityczną (uzyskiwanie szeregu informacji) oraz nad częścią biologiczną (interpretacja wyników). Jest to bardzo szczegółowe wprowadzenie z perspektywy powstawania mutacji chorobotwórczych, subtelnych różnic w budowie komórek zdrowych i nowotworowych. Omówione zostały takie zagadnienia jak metabolizm glukozy i glutationu, zmiany składu i funkcjonowania białek, homeostazy komórkowej i ich śmierci. Tu muszę podkreślić, że zaproponowanie przedstawienia tej wiedzy w formie tabel, tj. Tabela I.1 było dobrym pomysłem, inaczej byłby to trudny tekst. Także prezentacja leków przeciwnowotworowych, zakresu ich stosowania i mechanizmu oddziaływania na tkankę nowotworu (Tabela I.2) umożliwiło w sposób przystępny przedstawić ogrom wiedzy Doktorantki zdobytej po przeglądzie literatury fachowej. Szczególne miejsce w tym opisie znalazły cytostatyki oparte na cytotoksycznych kompleksach platyny i złota (Tabela I.3). Kolejną część przeglądu literaturowego stanowi przedstawienie metody a nie techniki (str. 43) spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężoną. Nie rozumiem wprowadzenia rozdziału 8. Wolałabym, aby w rozdziale 9 pt. „Podsumowanie części literaturowej” zaistniało powiązanie celu i podstaw literaturowych. Treść tego rozdziału to sugeruje, ale ilość wiedzy wskazanej w części teoretycznej jest znacznie szersza. Krótkie podstawy teoretyczne i dyskusja z wynikami innych naukowców w części eksperymentalnej, osobiście



bardziej odpowiada mi taka forma podawania wiedzy teoretycznej, a wiadomo, że będzie jej dużo z racji badań na pograniczu biologii komórek i chemii analitycznej.

Część Doświadczalna to opis ogromu eksperymentów biologicznych i analitycznych. Rozdział 3 opisuje badania prowadzone przez dr Haczyk-Więcek, były to hodowle komórek, separacje komórek samoczynnie odklejonych, odklejanie roztworem trypsyny oraz prowadzenia badań aktywności enzymatycznej. Mam tego fragmentu pracy pytanie, co zawierał roztwór odmywający pożywkę (str. 63)? Niestety mam zastrzeżenia co do sposobu prezentacji danych eksperymentalnych, czy wartość parametru IC50 (1/2 max. stężenia hamującego żywotność komórek płuc zdrowych i nowotworowych), czy dla komórek płuc jest to wartość średnia  $\pm$  odchylenie standardowe (tabela II.1). Według mnie nie zawsze zadbano o podanie odpowiedniej ilości cyfr znaczących w np. rozdziale 2: dlaczego taka dokładność objętości pożywki MEME do pojedynczych mikrolitów lub np. dla roztworów mrówczanu sodu, jodoacetamidu (str. 61), lub ubikwityny (str. 62) to dokładność określenia objętości determinuje dokładność wyznaczenia stężenia, do 2, 1 oraz 2 cyfr znaczących, odpowiednio. Dalej dane są też podawane zwykle z nadmiarem cyfr znaczących, np. Tabela II.10 ( $115,00 \pm 5,6 = 115 \pm 6$ ), czy Tabela II.11 ( $4,10 \pm 0,66 = 4,1 \pm 0,7$ )

Komórki po przygotowaniu do analizy specjacyjnej, według Autorki do „badania metalomu”, rozumiem zawartości Au i Pt, a nie składu pierwiastkowego zawartości danego jonu, jak w jonomice? Chciałabym, aby Autorka wyjaśniła schemat z rysunku II.1. Wydawało mi się, że frakcję samoczynnie odklejonych i odklejonych enzymatycznie były analizowane osobno, rysunek sugeruje ich łączenie. Procedury związane z preparatyką komórek są przedstawione bardzo dokładnie, zaś rozkład wodą królewską został jedynie wzmiankowany, czy wystarczała już mineralizacja w temperaturze pokojowej? Tabele na str. 70-72 przedstawiają dane z 10 powtórzeń, czy prezentowana wartość to wartość średnia? Część zwana analityczną jest ciekawa, a dbanie o jakość wyników była bardzo dobra, trzy sposoby nebulizacji przetestowano aż na 20 pomiarach. Istotne jest, aby przy tak niskich stężeniach Au i Pt być pewnym, czy aby ograniczeniem nie jest adsorpcji analitu na elementach transportujących analizowany roztwór. Złoto ma wyższy efekt tzw. pamięci układu niż platyna. Kwas solny sprzyja wymyciu platyny, gdyż kompleksy chlorkowe



chętniej tworzą platynowce, niż złoto. Tu bym pochyliła się także nad kompletnością rozkładu matrycy organicznej, jej nie całkowita mineralizacja może wpływać na badane parametry. Nie ma wyraźnie zaznaczone, jakie testy statystyczne wykorzystywała Doktorantka w określaniu, czy wyniki są od siebie „różne” np. Tabela II.10 – np.  $56,80 \pm 0,74$  a  $55,2 \pm 0,85$ . Ciekawy jest prosty zabieg normalizacji zaproponowany przez Panią Jakubczak, opisany na stronie 77. Przeliczenie na komórkę jest bardzo ciekawym i prostym podejściem. Pozwala on porównywać efektywność poszczególnych leków, czy wariantów nie tylko wtedy, gdy gęstość komórkowa jest podobna. Zaś, gdy ten parametr ulega zmianie to odchylenie od wartości średniej wyniku wzrasta. Pomogłoby czytelnikom w porównaniach, a ciągle jest to robione prezentowanie wyników w podobnej skali na obu osiach wykresów, tj. jest na Rysunku II.8. Bardzo ciekawe wnioski zostały sformułowane, na str. 78-79 dowiadujemy się, że cytostatyk oparty na złocie nie wpływa tak destrukcyjnie na komórki prawidłowe, jak oparte na Pt oraz bezwzględna akumulacja Au i Pt w komórkach nowotworowych jest porównywalna, ale współczynnik nagromadzenia dla złota jest znacznie korzystniejszy, przy niższym stężeniu wyjściowego leku. Frakcjonowanie operacyjne lizatów komórkowych wskazało, że Au dominuje we frakcji hydrofobowej komórek odklejanych enzymatycznie, jak i samoczynnie odklejonych a Pt dominuje we frakcji hydrofilowej w komórek odklejanych enzymatycznie, odwrotnie niż w samoczynnie odklejonych.

Kolejne badania prowadzone i opisane przez Doktorantkę dotyczą jonowej homeostazy, wykorzystywała tu metodą ICP MS, z odpowiednio zmodyfikowanym układem wprowadzającym próbkę, połączonym z komorą kolizyjną a następnie komorą służącą do rozcieńczania próbki. Tak złożony układ był niezbędny, gdyż matryca jest złożona, a wyniki oznaczania analitów mogą być obarczone błędami. Mam tu pytanie, czy „ślepa próba” to była tradycyjnie rozumiana ślepa próbka, czy rzeczywiście ślepa próba, czyli analiza próbki, która przeszła podobne/identyczne etapy, co próbki analizowane. Pani Jakubczak jest współtwórcą komory umożliwiającej pracę z materiałem komórkowym, czy ekstraktami i lizatami. Granice wykrywalności jest niższa (str. 88), co obniża liczbę komórek branych do analiz. Wprowadzenie komory kolizyjnej zwiększyło zakres stosowalności metody o nowe pierwiastki (Na, K, Se i Mg) i precyzję otrzymania wyników. I w tym etapie badań



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



formułowane są ciekawe wnioski, dotyczą one tym razem antagonizmów i synergii pomiędzy efektami wywołanymi dodaniem cytotoksycznych związków Au i Pt do hodowli komórek. Dobrze, że Doktorantka swoje obserwacje poparła odsyłaczami literaturowymi. Mnie osobiście zainteresował fragment o selenie, szkoda, że tak mało jest na ten temat. Stwierdzono, że stres oksydacyjny wywołany reaktywnymi formami tlenu może prowadzić do śmierci komórki, obecność Cu, Mo, Zn, czy Mn wskazuje na odpowiedź komórek. Na stronach 91-93 przedstawiła Autorka graficzną ilustrację otrzymanych wyników, w formie tzw. mapy cieplnej. Chyba coś jest nie tak z przedstawioną skalą.

Kolejny ważny etap pracy to połączenie technik rozdzielania z detekcją pierwiastkową, co dawało możliwość selektywnego „śledzenia sygnałów” od dużych związków organicznych po konkretnym metalu. Rozdz. 5.5.1 według mnie powinien być w części pracy opisującej stosowaną aparaturę i sprzęt. Rozdzielenie próbki komórek rakowych i prawidłowych na kolumnie wykluczenia wskazało frakcje i grupy związków powstających pod wpływem działania cytostatyków opartych o Au i Pt (synteza pod wpływem obecności zaadsorbowanego w komórce metalu). Zaś detekcja pierwiastkowa umożliwiła kontrolę, w jakich frakcjach Au i Pt występują. Także i tu Doktorantka wspiera się już opublikowanymi danymi w interpretacji uzyskanych przez siebie wyników. Dla mnie, jako praktyka określenie trwałości obiektu badań w materiale przygotowany lub/i przechowywanym, czyli zamrażania i rozmrażania jest ważne. Wykorzystanie chromatografii w układzie faz odwróconych wspartej oczyszczaniem lizatów lub zatężeniem przez technikę ekstrakcji do fazy stałej było kolejnym krokiem. Trochę czuję niedosyt informacyjny o tej procedurze. Następnie zastosowanie elektroforetycznego rozdzielania pozwoliło na analizę zjonizowanych hydrofilowych związków. Także i ta technika w połączeniu z detekcją metodą ICP MS pozwoliła wskazać różnice w odpowiedzi komórek na stres wywołany związkiem złota lub platyny i porównać do grupy kontrolnej. Mam nadzieję, że rozumiem tu poprawnie grupę kontrolną, ale wyjaśnienie tego pojęcia byłoby pomocne. Wiemy z wyników opisanych badań, że peptydowe addukty z pochodnymi auranofiny są bardziej polarne niż z pochodnymi cisplatyny oraz że obecność cisplatyny indukuje większą ilość związków małowcząsteczkowych zarówno kationowych, jak i anionowych, zaś obecność auranofiny to



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



powiązanie Au z cząsteczkami wielkocząsteczkowymi. Ogrom uzyskanych i przedstawianych danych powodował czasami trudność w podążaniu za tokiem myślenia Autorki, tu wspomagały dobrze przedstawione chromatogramy lub elektroferogramy.

W części nazwanej Podsumowanie i Wnioski Pani Wioletta Jakubczak zestawiała najistotniejsze wyniki i obserwacje oraz wnioski z tych obserwacji idące. Zgadzam się z Doktorantką, że wartością dodaną jej eksperymentów może być ograniczenia czasu trwania badań przed klinicznych i że testy hodowlane ograniczą wykorzystanie zwierząt laboratoryjnych. Obserwacje biochemiczne prowadzą do porównania efektów oddziaływania cisplatyny i auronofiny, na ich lub ich pochodnych akumulację, równowagę jonową, zdolności do adhezji, powinowactwo do poszczególnych metabolitów np. histydyny, czy reszt aminokwasowych. Te wyniki to efekt analizy chemicznej z wykorzystaniem szeregu procedur, technik, czy metod analitycznych. Działania te miały na celu maksymalne obniżenie granic wykrywalności (dołączenie etapu z ekstrakcją do fazy stałej, czy gradientu potencjałowego), poszerzenie zakresu aplikacyjności, czy precyzji pomiaru (np. komory kolizyjne z różnymi gazami reakcyjnymi). Autorka wskazała, że czynnikiem wpływającym na adhezję komórek jest zawartość jonów wapnia i magnezu. Wdrożenie szeregu technik rozdzielania chromatograficznego (różne zjawiska) pozwoliło powiedzieć coś o wielkości adduktów peptydowych, o ich powinowactwie do związków różniących się hydrofobowością, czy ich ładunku.

Wprowadzone zostały także autorskie rozwiązania podczas prowadzenia eksperymentów tj. przepływowy mikroukład, co ograniczyło 20.krotnie objętość stosowanej próbki, czy metoda normalizująca wyniki zawartości poszczególnych pierwiastków uwzględniająca liczbę analizowanych komórek.

Rozdział nazwany Bibliografia zawiera 135 odnośników, gdzie największą część stanowią anglojęzyczne publikacje, chciałam podkreślić, że stanowi to rzetelny przegląd literaturowy. Znajdują się tam prace z lat 60. XX wieku, jak i najnowsze z 2018 roku.

Moje uwagi edytorskie i stylistyczne, które w formie przykładów wymienię poniżej nie umniejszają walorów merytorycznych rozprawy i nie rzutują na końcowy wniosek. Podobało mi się wprowadzenie tak dużej ilości prezentacji graficznych w formie złożonych



UNIwersYTET  
WARszAWSKI

Wydział Chemii



grafów, czy układów graficznych. Ogólnie oceniając język rozprawy jest poprawny, choć są drobne błędy interpunkcyjne (np. str. 33), stylistyczne (np. str. 19) i logiczne (np. stężenie jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$  – str. 27. Razi jednak nadużywanie zwrotu „za pomocą”, aż trudno zliczyć ile razy go wykorzystano, według mnie w większości przypadków jest zbędny, nawet w tytule wystarczyło by „Przemiany cytotoksycznych kompleksów ... badane spektrometrią mas”. W tekście powinny być zapis prawidłowym kwasów np. kwasu azotowego(V) (np. str. 47), gdzie nie gdzie wkradł się żargon laboratoryjny (str. 47 – „zwiększy wydajność i precyzję SPE” raczej rozdzielania lub „proces ...wzbogacania ... pogarsza precyzję metody” raczej procedury). Nie ma potrzeby po tak dokładnym spisie skrótów używać ich w tytułach (np. str. 50). Chciałam zauważyć, że istnieją skróty polskie na granicę wykrywalności i oznaczalności, GW i GO, odpowiednio. Jako chemik preferuję zapis  $\mu\text{mol L}^{-1}$  niż  $\mu\text{M}$ . Uwagi powyższe czynię z racji pozycji recenzenta.

Pomimo powyższych zastrzeżeń, które oczywiście mają charakter dyskusyjny, chciałbym wyrazić moje uznanie dla ogromu wykonanej pracy laboratoryjnej. Godne odkreślenia jest połączenie biologii z chemią analityczną.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy mogę stwierdzić, że praca Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak w pełni spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do kolejnych etapów procedury i publicznej dyskusji nad rozprawą.

Beata Krasnołębska-Ostręga