



Prof. UAM dr hab. Anetta Ziola-Frankowska
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii
Zakład Chemii Analitycznej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań 18.11.2019

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak pt.:
„Przemiany cytotoksycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową
homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas”

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr inż. Wioletty Jakubczak „*Przemiany cytotoksycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas*” została wykonana w Katedrze Chemii Analitycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod opieką promotora dr hab. inż. Katarzyny Pawlak, prof. PW. Przedstawione w pracy wyniki badań realizowane były w ramach projektu badawczego „Opracowanie metod badania zaburzeń równowagi jonomicznej i ich genezy w komórkach rakowych poddawanych działaniu cytostatyków” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2013/09/B/ST4/00961. Tematyka pracy wpisuje się w obszar zainteresowań badawczych promotora dr hab. inż. Katarzyny Pawlak, prof. PW i dotyczy badań z zakresu chemii analitycznej oraz z zakresu biochemii, zwłaszcza w aspekcie metalomiki i jonomiki.

Tematyka podjęta w rozprawie jest bardzo aktualna i dotyczy badań nad wpływem cytostatyków na przemiany różnych jonów metali. Biorąc pod uwagę potwierdzoną ich istotną rolę w leczeniu chorób nowotworowych, każde podjęte badania nad tą grupą związków budzi zainteresowanie i daje nowe możliwości ich efektywniejszego wykorzystania, a co za tym idzie zwiększa szanse na wyleczenie pacjenta. Należy podkreślić, że choroby nowotworowe są zaraz po chorobach układu krążenia przyczyną śmierci pacjentów. Niekorzystnym skutkiem stosowania leków cytostatycznych w terapii chorób nowotworowych jest ich wysoka toksyczność oraz występująca w czasie terapii oporność komórek nowotworowych na stosowany cytostatyk. Jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwnowotworowych należących do grupy leków platynowych jest cisplatyna. Lek ten posiada właściwości hamujące podział komórek i jest wykorzystywany w leczeniu nowotworów m.in. jąder, jajników, głowy czy płuc. Pomimo wysokiej skuteczności cisplatyny terapia tym lekiem związana jest ze skutkami ubocznymi, w tym nabywana przez komórki nowotworowe oporność na chemoterapeutyk oraz występująca wysoka toksyczność leku względem zdrowych komórek. Stąd cały czas trwające badania nad lekami o mniejszej oporności i zwiększonej cytotoksyczności.

Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
tel. 61 829 1767

Jednym z takich leków jest auranofina, cytostatyk na bazie złota, który charakteryzuje się porównywalną aktywnością przeciwnowotworową, jak cisplatyna, dając nowe możliwości w tworzeniu nowej generacji leków z odmiennym profilem wrażliwych komórek nowotworowych. Należy podkreślić, że w recenzowanej dysertacji zostały przebadane oba cytostatyki.

Doktorantka podjęła również w swojej pracy tematykę z zakresu nowoczesnych metod instrumentalnych, w tym metod spektrometrycznych i chromatograficznych. Materiał biologiczny, charakteryzujący się złożoną matrycą, w znaczący sposób utrudnia proces analityczny zarówno pod kątem jakościowym, jak i ilościowym wybranych analitów. Stąd w ostatnich latach w literaturze światowej obserwuje się intensywny rozwój badań związanych z udoskonalaniem, stosunkowo dobrze poznanych i opisanych metod spektralnych w tym spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Tym bardziej, dużym wyzwaniem dla analityka jest zaproponowanie nowych rozwiązań w tej dziedzinie, mających na celu poprawę parametrów związanych z przygotowaniem próbki, transportem uzyskanego aerozolu do plazmy, etapu jonizacji czy detekcją, zwłaszcza podczas analizy próbek biologicznych.

Ocena merytoryczna rozprawy

Niniejsza rozprawa doktorska została przedstawiona w formie książkowej. Składa się z 15 rozdziałów ponumerowanych i jednego bez numeracji (Bibliografia). Praca napisana jest w języku polskim i nie ma w pełni klasycznego układu. Dysertacja rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów oraz definicji stosowanych pojęć. Następnie zamieszczono spis treści, dalej streszczenie w języku polskim i w języku angielskim oraz cel pracy. Część literaturowa pracy zawiera dziewięć rozdziałów, a część doświadczalna składa się sześciu rozdziałów, w tym cztery rozdziały związane są z metodyką i materiałem badawczym, a pozostałe dwa rozdziały odnoszą się do omówienia wyników i ich podsumowania. Na końcu pracy znajduje się Bibliografia, która obejmuje 135 pozycji literaturowych zarówno polskich i jak zagranicznych, z przewagą tych drugich. Praca liczy 127 stron, zilustrowana jest 42 rysunkami i zawiera 24 tabele. W tym miejscu należy podkreślić starania doktorantki o atrakcyjną szatę graficzną pracy, zarówno w części literaturowej, jak i doświadczalnej. Niestety w kilku miejscach zbyt małe rozmiary wykresów utrudniają czytelnikowi ich właściwe odczytanie i analizę. Praca zawiera błędy edytorskie oraz nadużycia związane z stosowaniem żargonu analitycznego lub anglicyzmów.

Wartość merytoryczna i użytkowa

Część literaturowa recenzowanej rozprawy poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, w którym przedstawiono ogólny zarys merytoryczny pracy oraz podsumowanie efektów przeprowadzonych analiz i badań. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że należałoby trochę bardziej wyszczególnić rodzaj i zakres prowadzonych prac w zakresie badań przy zastosowaniu spektrometru ICP-MS i uzyskanych wyników związanych z badaniami nad wybranymi cytostatykami. Na przykład, należałoby wymienić jakie metale były analizowane. Ponadto w streszczeniu nie wskazano wyraźnie, co stanowi nowość naukową, zarówno w aspekcie analitycznym oraz biochemicznym.

Cel pracy został umieszczony na początku dysertacji, zaraz po streszczeniu w języku angielskim. Niestety cel sformułowano bardzo ogólnikowo. Biorąc pod uwagę szeroki zakres wykonanych przez Doktorantkę prac analitycznych i biochemicznych, szkoda że nie sprecyzowano poszczególnych celów zgodnie z etapami prac.

Część teoretyczna dotyczy głównie zagadnień związanych z budową i funkcjonowaniem komórek zdrowych i nowotworowych. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę życia komórki zdrowej i chorej oraz opisuje czynniki, które bezpośrednio wpływają na ich stany. Jednym z takich czynników jest wpływ jonów metali na homeostazę obu typów komórek, opisany w części 3.3.

W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że w podrozdziale tym opisano głównie wpływ na komórki nowotworowe. Ponadto bardzo skrótowo opisano wpływ i działanie tylko części metali, bez komentarza co do pozostałych pierwiastków, które zostały oznaczone np. w lizatach komórkowych. Uważam, że podjęta tematyka tej części pracy jest istotna, zwłaszcza, że badanie homeostazy jonów metali, było jednym z głównych założeń doktorantki. W dalszej części pracy opisane zostały cztery rodzaje śmierci komórki. Moja uwaga do tej części (rozdział 4) związana jest z brakiem odnośników literaturowych do poszczególnych akapitów, gdzie opisywane są rodzaje śmierci komórki. Z kolei w rozdziale piątym dokonano opisu stosowanych leków przeciwnowotworowych oraz stosowanych cytostatyków. Osobiście uważam, że tabela I.2 jest zbyt szczegółowa i nie wnosi niezbędnych informacji z punktu widzenia prowadzonych prac eksperymentalnych. Według mojej opinii tabela ta powinna być skrócona. Natomiast bardziej rozbudowany powinien być podrozdział 5.1, który opisuje działanie kompleksów metali jako cytostatyków, zwłaszcza że to właśnie ta grupa związków była badana przez doktorantkę i jest ona dosyć dobrze przebadana, co przekłada się na ilość publikacji z tej tematyki. Szkoda, że doktorantka nie wykazała się w tej części, co już zostało zrobione/przebadane odnośnie cisplatyny i auronofiny w aspekcie stosowania ich jako leków przeciwnowotworowych i ich wpływu na homeostazę komórek zdrowych i chorych. Krótkie podsumowanie literaturowe w większym stopniu podkreśliłoby realizowane przez doktorantkę nowe podejście zarówno pod kątem analityki tych związków oraz w odniesieniu do ich nowych możliwości jako cytostatyków. Kolejne rozdziały dotyczą opisu wykorzystanych przez doktorantkę technik analitycznych, w tym techniki ICP-MS oraz metod separacyjnych. W tej części zabrakło charakterystyki stosowanych technik analitycznych pod kątem analiz materiału biologicznego, zwłaszcza wskazania trudności analitycznych, jakie występują podczas oznaczeń próbek o tak złożonej matrycy. Rozdział 8, wraz z podrozdziałem 8.1, powinien być umieszczony po rozdziale 5, ponieważ dotyczy on oddziaływań leków na organizm ludzki w ujęciu farmakokinetycznym i farmakodynamicznym. Część literaturowa zakończona jest krótkim podsumowaniem, które kończy się konkluzją że *badanie specjacji cytotoksycznych kompleksów metali jest kluczowe przy określeniu ich przemian we krwi czy cytozolu*. Natomiast w całej części literaturowej nie podjęto próby opisanie tego tematu, zwłaszcza że to właśnie dana forma pierwiastka określa jego stopień i rodzaj oddziaływania.

Pomimo kilku uwag krytycznych uważam, że w części literaturowej doktorantka dobrze przedstawiła zakres tematyczny swojej pracy zarówno z obszaru chemii, jak i biologii, potwierdzając tym samym interdyscyplinarność prowadzonych badań i swoje dobre przygotowanie merytoryczne do realizacji głównego celu pracy.

Drugą częścią pracy jest część doświadczalna, w której zamieszczono zarówno rozdziały związane z opisem stosowanych metod przygotowania próbek oraz omówieniem uzyskanych wyników badań. W części eksperymentalnej doktorantka przedstawiła charakterystykę stosowanych odczynników, wraz z ich sposobem przygotowania, spis aparatury badawczo-pomiarowej oraz poszczególne procedury związane z przygotowaniem i oznaczeniem analitów. Istotną częścią tej części pracy był etap związany z przygotowaniem materiału badawczego, którym były komórki nowotworowe A549 (nowotwór płuc) oraz komórki zdrowe MRC-5 oraz ich ocena biologiczna. Z informacji zawartych w pracy wynika, że ta część badań realizowana była w innych laboratoriach. Brak jest tutaj informacji czy doktorantka miała możliwość uczestniczenia w tych badaniach oraz czy brała udział przy wyborze danej metody przygotowania i oceny obu linii komórkowych?

Kolejne rozdziały opisują analitykę zawartości wybranych metali, w tym złota i platyny w otrzymanych lizatach i mineralizatach przy wykorzystaniu techniki ICP-MS oraz przedstawiają wyniki analizy specjacyjnej złota i platyny przy zastosowaniu technik chromatograficznych w układzie technik łączonych ze spektrometrem ICP-MS. Na koniec doktorantka podsumowała wyniki swoich badań z części biochemicznej i analitycznej.

Oceniając część doświadczalną recenzowanej pracy należy podkreślić, że wykonano w niej szeroki zakres analiz chemicznych i biochemicznych, przy wykorzystaniu szerokiego spektrum metod analitycznych, co niewątpliwie wskazuje na rzetelny warsztat pracy doktorantki, zwłaszcza jako analityka. Niestety, w pracy zdecydowanie zabrakło dyskusji uzyskanych przez doktorantkę wyników badań zarówno z etapów optymalizacji, jak i samych już wyników końcowych w odniesieniu to uzyskanych wyników badań innych badaczy. Dyskusja taka z pewnością ułatwiłaby prezentację przeprowadzonych badań stanowiących nowe podejście do problemu analityki próbek biologicznych i samych cytostatyków.

W związku z pewnymi brakami i nieścisłościami w pracy, w obowiązku recenzenta jest ich wskazanie i poddanie do dyskusji. Dlatego proszę o wyjaśnienie:

- Czy opisana metoda hodowli komórek (rozdział 3) była prowadzona na podstawie własnej metody i czy któryś z etapów tej procedury był poddany optymalizacji, np. czas poszczególnych etapów, rodzaj i objętość stosowanych odczynników?

- Czy przeprowadzono optymalizację procedury mineralizacji (rozdział 4.1) próbek zawiesiny komórkowej, jeśli tak to w jakim zakresie? Czy sprawdzano odzysk metody?

- Opisana procedura przygotowania liz komórkowych jest bardzo złożona (rozdział 4.2), co może być źródłem błędów i straty analitu. Czy sprawdzono odzysk zastosowanej metody frakcjonowania? Czy sprawdzano powtarzalność tej metody?

- str. 70; Na jakiej podstawie zdecydowano się na wykonywanie 10 powtórzeń przy oznaczaniu liczebności komórek?

- str. 70-72; W jakim celu stosowano różne stężenia leków w testach cytotoxyczności dla danej linii komórkowej (tabela II.2-II5)?

- Na jakiej podstawie do analizy zawartości złota, platyny i pozostałych metali wybrano tylko komórki poddane działaniu cytostatyku przez 72h? Czy wykonywano analizę wielopierwiastkową dla 24 i 48 h czasu inkubacji?

- str. 73; Tabela II.6 - sprawdzanie różnych typów rozpylaczy powinno się prowadzić w takich samych warunkach pracy spektrometru. Proszę uzasadnić dlaczego stosowano różne warunki przepływu gazu i cieczy?

- str. 85; W tabeli II.13 podano informacje, że jako wzorzec wewnętrzny zastosowano izotop Y(89) i Rh(103). Proszę o komentarz czy nie lepiej byłoby stosować szerszą gamę izotopów (np. Sc, Ta, Ge, Ga), biorąc pod uwagę jakie metale zostały poddane analizie techniką ICP-MS?

- str. 87; Tabela II.15 i II. 16 - przedstawiono wyniki analiz zawartości mikroelementów w lizatach i mineralizatach dla różnych rozcieńczeń próbki. Proszę wyjaśnić skąd tak duże różnice w oznaczonych poziomach stężeń pierwiastków dla różnych rozcieńczeń ?

- Analizę specyjną złota i platyny doktorantka prowadziła przy wykorzystaniu technik separacyjnych. Czy podane w tabelach II.18 i II.19 warunki procesu rozdzielania chromatograficznego są wynikiem optymalizacji obu technik chromatograficznych (czy sprawdzano inne kolumny analityczne, skład fazy ruchomej, natężenie przepływu fazy ruchomej czy objętość pętli dozującej ?)

Uwagi szczegółowe

- brak definicji dla IC₅₀ w wykazie skrótów

- przy tytułach poszczególnych rozdziałów umieszczono odnośnik literaturowy, zarówno w spisie treści, jak i w dalszej części pracy doktorskiej (np. str. 29, 48, 50);

- „nebulizer” (np. str. 73, 74) - powinno być – rozpylacz;

- „całkowitej ilość platyny i złota” (str.75)- powinno być- całkowita zawartość platyny i złota

- tabela II.20 i 21(str. 104, 107)- aparat – IC MS 7500 ?

- rysunki II.14-16 (str.91-93)- mało czytelne, biorąc pod uwagę ilość przedstawionych wyników;

Chciałabym podkreślić, że powyższe uwagi i komentarze mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają mojej pozytywnej oceny recenzowanej pracy doktorskiej. Podsumowując chciałabym jednoznacznie stwierdzić, że postawiony cel pracy został zrealizowany, a otrzymane wyniki są interdyscyplinarne oraz mają istotny aspekt naukowy. Doktorantka w pracy eksperymentalnej wykorzystwała wiele komplementarnych metod instrumentalnych, o czym świadczy szeroki zakres uzyskanych wyników badań. Za najważniejsze dokonania doktorantki, będące nowością naukową, uważam:

- zaprojektowanie obojętnie chemicznego, przepływowego układu dozowania małych objętości próbek, które umożliwiło analizę zawartości wybranych pierwiastków w małej objętości próbki biologicznej techniką ICP-MS, przy jednoczesnym zachowaniu dobrej czułości;
- wykorzystanie układu technik łączonych (techniki separacyjne w połączeniu z ICP-MS) w analizie specyficjnej złota i platyny w lekach, które pozwoliło na określenie reaktywności układu cytotatyk-bioligand w środowisku komórek nowotworowych i zdrowych;
- dobranie warunków pracy spektrometru ICP-MS do analizy wielopierwiastkowej w materiale biologicznym;
- przeprowadzenie badań cytotoxycznosci wybranych leków wraz z ich rozbudowaną oceną pod względem ich reaktywności, różnic i wpływu na homeostazę metali w komórkach rakowych i zdrowych. Uzyskane wyniki badań dla cisplatyny i auranofiny przy zastosowaniu technik analitycznych umożliwiły na wykazanie konkretnych zależności tych metaloleków z metalami dla badanych linii komórkowych. Poznanie mechanizmów aktywności cytotatyków i zdefiniowanie czynników wpływających na ich działanie, jest niezmiernie istotne, przy opracowywaniu nowych leków, o lepszej selektywności i mniejszej toksycznosci.

Do recenzowanej pracy dostarczono również spis dorobku naukowego doktorantki, który oceniam bardzo pozytywnie. Biorąc pod uwagę zakres wykonanych prac eksperymentalnych, na podkreślenie zasługuje wysoka aktywność konferencyjna. Dorobek naukowy mgr inż. Wioletty Jakubczak (obejmuje współautorstwo 4 prac (w tym 2 w czasopismach z listy JCR) oraz 1 pracy w czasopiśmie o zasięgu krajowym oraz 1 rozdział w monografii. Doktorantka brała aktywny udział w konferencjach krajowych i zagranicznych, gdzie 15 razy prezentowała wyniki badań jako komunikaty ustne oraz 14 razy jako wystąpienia posterowe. Ponadto jest współautorką zgłoszenia patentowego P.418883 (2016). Otrzymała również 3 miesięczny staż naukowy w ramach programu Erasmus Plus. Uczestniczyła jako wykonawca projektu badawczego współfinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak pt. „Przemiany cytotoxycznych kompleksów złota i platyny i ich wpływ na komórkową homeostazę jonów metali, badane za pomocą spektrometrii mas” spełnia wymagania sformułowane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Wioletty Jakubczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Anetta Ziola-Frankowska