

Dr hab. inż. prof. Marcin Łukaszewicz
Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. Fryderyka Joliot-Curie 14a, 50-383 Wrocław
marcin.lukaszewicz@uwr.edu.pl
tel. 512 344 666

Wrocław, 25.10.2018 r.

Dziekan i Rada Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Żal pt. „Wybrane właściwości biologiczne aryloiloacetylenowych kompleksów złota (I) – próba identyfikacji zastosowań terapeutycznych”

Rozprawa mgr Aleksandry Żal pt. "Wybrane właściwości biologiczne aryloiloacetylenowych kompleksów złota (I) – próba identyfikacji zastosowań terapeutycznych" dotyczy bardzo istotnego problemu związanego z poznaniem mechanizmów działania leków na bazie złota oraz nowych zastosowań tych leków. Celem prowadzonych badań była próba odpowiedzi na kilka bardzo istotnych pytań wymienionych w czterech punktach. Dotyczą one antyproliferacyjnych, prooksydacyjnych i antygrzybiczych właściwości syntetyzowanych związków złota. Dodatkowym celem było zbadanie udziału białek oporności wielolekowej w wypompowywaniu związków złota na zewnątrz komórek.

Badanie mechanizmów działania różnych leków jest procesem żmudnym, trudnym i długotrwałym. W wielu przypadkach mechanizm działania substancji aktywnych jest słabo poznany, mimo stosowania go w lecznictwie od kilkudziesięciu lat. Złoto, którego aktywność biologiczna była znana jeszcze przed rozwojem współczesnej nauki, jest tego szczególnym przykładem ze względu na tradycyjne różnorodne zastosowania (w tym spożywcze, np. gdańska wódka Goldwasser). Rozprawa doktorska Aleksandry Żal jest przedstawiona na 134 stronach. Praca składa się z dziewięciu rozdziałów typowych dla rozprawy doktorskiej i pod względem formalnym jest napisana poprawnie.

Wstęp jest przejrzysty, ciekawy, dobrze napisany i adekwatny do celów oraz wyników opisywanych w pracy. Rolą recenzenta jest jednakże wskazanie również słabszych stron prezentowanej pracy. Ze względu na długą historię stosowania złota i powszechność kontaktu z nim, chociażby w postaci biżuterii, warto byłoby we wstępie choć kilka zdań poświęcić oddziaływaniu złota Au (0) na komórki eukariotyczne, w szczególności ludzkie. Ponieważ praca dotyczy badania aktywności biologicznej szeregu syntetyzowanych związków uważam, że zbyt lakonicznie opisane zostały same związki (np. na stronie 9 i rys. 1.3), jak również sam dobór tworzonych struktur chemicznych. Poznanie zależności pomiędzy strukturą a funkcją jest bardzo ważnym zagadnieniem, umożliwiającym racjonalne tworzenie nowych struktur chemicznych, które mogą stać się w przyszłości skutecznymi lekami.

Drugim rozdziałem jest cel pracy, który został jasno sprecyzowany i bardzo dobrze dobrany w aspekcie aktualnego stanu wiedzy i prowadzonych na świecie badań.

Kolejny, trzeci rozdział to materiały i metody. Jest on w zasadzie prawidłowo i wyczerpująco napisany, jednak, - w celu dydaktycznym - chciałbym zwrócić uwagę na często spotykany błąd nomenklaturowy. Nazwa drożdże odnosi się w zasadzie do rodzaju *Saccharomyces*. Nie jest zatem poprawne nazywanie rodzaju *Candida* drożdżami. Odnośnie rodzaju *Candida*, najczęściej w języku polskim mówimy o drożdżakach, który w taksonomii definiuje rząd (Saccharomycetes). Polska nazwa (coraz rzadziej spotykana) gatunku *Candida albicans* to bielnik biały. Drugim błędem nomenklaturowych, na który chciałbym zwrócić uwagę, to tytuł podrozdziału 3.2.12 „Ocena wpływu kompleksów złota na cykl rozwojowy *Candida albicans*”. W sekcji tej zostały opisane sposoby wyznaczania krzywych wzrostu, obliczania czasu podwojenia populacji oraz wyznaczania MIC (ang. minimal inhibitory concentration). Sekcja ta nie opisuje więc metod dotyczących badania użytego w tytule terminu „cykl rozwojowy”, który definiowany jest jako proces przemiany pokoleń.

Jak w każdej pracy naukowej, najistotniejszą sekcją są wyniki (rozdział czwarty). Rozdział ten rozpoczyna się od uzasadnienia wyboru modelu badawczego. Jest to dość oryginalne i ciekawe rozwiązanie. Model zakłada przebadanie właściwości szeregu związków złota podzielonych na trzy grupy na komórkach ludzkich i komórkach oportunistycznego patogenu *Candida albicans*. W badaniach wykorzystano trzy nowotworowe linie komórkowe o różnym pochodzeniu oraz sublinie wyprowadzone z jednej z trzech linii (SW6200) o różnej wrażliwości na leki. Podobnie w badaniach bielnika białego użyto trzy linie o zróżnicowanej oporności na leki przeciwgrzybowe. Model jest zgodny z założonymi celami związanymi z

badaniem mechanizmów aktywności biologicznej związków złota. Zwykle jednak w dalszej perspektywie zakłada się wykorzystanie badanych związków jako leków. Podstawowym problemem uniemożliwiającym wykorzystanie wielu substancji cytotoksycznych w leczeniu jest ich cytotoksyczność, dobrze opisana dla związków złota we wstępie przez autorkę. Jest więc bardzo istotne poszukiwanie związków o selektywnej aktywności cytotoksycznej, np. dla komórek nowotworowych, ale nie dla zdrowych. Dlatego też trochę brakuje w przedstawionym modelu kontroli z liniami komórkowymi nienowotworowymi. Oczywiście zdaję sobie sprawę, że jest to zagadnienie relatywnie trudne, choćby ze względu na różnice morfologiczne i tempo podziałów. Niemniej jednak aspekt ten warto mieć na uwadze, aby odpowiednio planować dalsze prace i eksperymenty, np. związane z najbardziej obiecującymi nowymi badanymi związkami złota.

W pierwszej kolejności autorka przeprowadziła szereg eksperymentów i otrzymała wiele interesujących wyników na komórkach ludzkich linii nowotworowych. Tego typu doświadczenia są bardzo pracochłonne, wymagają rygorystycznego przestrzegania procedur ze względu na wrażliwość komórek oraz zachowania jałowości. Bardzo ciężko jest również kontrolować wszystkie parametry wpływające na powtarzalność otrzymywanych wyników. Warto więc zwrócić uwagę na to, że otrzymane przez doktorantkę wyniki są bardzo ciekawe, a przy tym powtarzalne. Świadczy to o nabyciu dużej wprawy i doświadczenia w prowadzonych pracach eksperymentalnych. Opisane liczne wyniki (wykonane zostały krzywe przeżywalności dla 29 związków na 6 liniach komórkowych) świadczą o dużym nakładzie pracy autorki. Ponieważ autorka otrzymała ciekawe wyniki i można domyślać się, że prace będą kontynuowane, warto rozważyć rozwiązania techniczne zmniejszające nakład pracy i pozwalające szybciej i taniej uzyskiwać wyniki. Recenzenci oceniający rezultaty wyników publikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach nie będą doceniali nakładu pracy, jeżeli istnieją efektywniejsze metody. Na przykład prezentowane w pracy wyniki wpływu związków złota na proliferację linii komórkowych znacznie szybciej i łatwiej uzyskuje się z wykorzystaniem zautomatyzowanego systemu do hodowli i przyżyciowej analizy typu IncuCyte. Warto więc w dyskusji i przyszłych planach uwzględnić ten aspekt.

Na podstawie wykonanych krzywych przeżywalności komórek w zależności od stężenia testowanych związków wyliczony został współczynnik IC50. Z czysto metodologicznego punktu widzenia, dotyczącego dokładności wyliczanych wartości IC50 warto zwrócić uwagę, że dla niektórych eksperymentów wyliczany był on praktycznie na podstawie dwóch z

dziwięciu testowanych stężeń (np. DP-110 na rys. 4.6 czy Au-2 na rys. 4.7). Oczywiście, o ile rząd wielkości testowany w skali logarytmicznej jest oczywisty, sama wartość wydaje się być znacznie mniej dokładana. Można by się również zastanowić się, czy nie można ograniczyć ilości eksperymentów przez lepiej dobranym testowaniu stężenia badanych związków.

W kolejnej sekcji był badany wpływ kompleksów złota na homeostazę redoks, w szczególności w oparciu o analizę grup SH. Autorka wykazała, że część badanych związków istotnie zaburza równowagę redoks. W części tej brakuje głębszej analizy zależności między strukturą a obserwowaną aktywnością czy relacji między stężeniem badanego związku a obserwowaną aktywnością pro oksydacyjną.

Dodatkowym modelem eksperymentalnym były szczepy drożdżaków *Cadndida albicans* o różnej oporności na stosowane leki przeciwgrzybowe. Badania były prowadzone dosyć niekonwencjonalnie. Zwykle rozpoczyna się je od wyznaczenia klasycznymi metodami minimalnych stężeń hamujących wzrost (MIC). W przypadku recenzowanej pracy (prawdopodobnie ze względu na dostęp do stosownego sprzętu) rozpoczęto je od badania krzywych wzrostu, czasu wejścia w fazę logarytmiczną i czasu podwojenia w zależności od stężenia badanych związków. Również dla tego modelu uzyskane zostały bardzo obiecujące wyniki, ponieważ niektóre z analizowanych związków wykazywały wysoką aktywność przeciwgrzybową na wszystkie badane szczepy. W sekcji tej należy zwrócić uwagę na formalnie niepoprawne tytuły tabel, np. 4.8, 4.9 itd. Tytuł tabeli „Czas opóźnienia...” sugeruje różnicę pomiędzy czasem oczekiwanym (np. dla kontroli) a czasem stwierdzonym dla badanych warunków (np. badanego stężenia określonego związku). Tymczasem w tabeli przedstawiane są faktyczne czasy wejścia w określoną fazę, a nie- jak sugeruje tytuł tabeli – różnicę, czyli opóźnienie.

Ostania sekcja 4.8 dotyczy analizy UV/VIS wybranych związków. Uważam, że ta sekcja powinna znaleźć się na samym początku wyników jako element badania, weryfikacji i opisu badanych w dalszej części związków.

Piątym, typowym rozdziałem po wynikach, jest dyskusja. Jest to zwykle najtrudniejszy do napisania rozdział, z którym autorka poradziła sobie względnie dobrze. Z czysto redakcyjnego punktu widzenia warto jednak zwrócić uwagę, że w publikacjach naukowych dość często wplata się w wyniki jednoczesną ich dyskusję i ewentualnie wydziela krótszy już rozdział z podsumowaniem i wnioskami. W pracach doktorskich to podejście jest mniej

ortodoksyjne, ale przy dużej ilości wyników może znacznie ułatwić ich zrozumienie i interpretację. W recenzowanej pracy podejście redakcyjne jest bardzo ortodoksyjne. W rozdziale Wyniki faktycznie pokazywane były wyłącznie wyniki z bardzo oszczędnym komentarzem czy wnioskami, które ciężko odnaleźć w dyskusji lub są moim zdaniem zbyt ogólnikowe. Skrajnym przypadkiem jest np. rozdział przedstawiający widma absorpcji, których interpretacja w dyskusji jest również bardzo oszczędna.

Szósty rozdział pracy to wnioski przedstawione w czterech bardzo klarownych i jasnych punktach. Ten rozdział został bardzo dobrze zredagowany i w tym przypadku bardzo sobie cenię zwięzłość i jednoznaczność.

Kolejnymi typowymi rozdziałami są streszczenia w języku polskim i angielskim, które są dobrze i klarownie napisane. Streszczenia są bardzo istotną częścią prac naukowych. Warto jest więc starać się przekazać maksymalnie dużo informacji przy jednoczesnym zachowaniu klarowności i przystępności oraz atrakcyjności. Prezentowane streszczenia są klarowne i przyjazne czytelnikowi, co w pracy doktorskiej jest właściwym podejściem. W przypadku publikacji w czasopiśmie naukowym warto jednak mieć na uwadze, aby w streszczeniu zamieścić więcej szczegółowych informacji.

Ostatnim, dziewiątym rozdziałem pracy jest bibliografia, zawierająca 140 pozycji. Jest ona dobrze zredagowana oraz prawidłowo dobrana.

Generalnie praca została dobrze i starannie napisana oraz zredagowana. W obszernej pracy znalazłem stosunkowo mało błędów formalnych czy stylistycznych. Jedynym, na który chciałbym w tym miejscu zwrócić uwagę, to użycie słowa „wypadek” zamiast „przypadek”.

Te drobne błędy redakcyjno-edytorskie nie mają wpływu na ogólną ocenę ogólnie wartościowej pracy.

Podjęty przez Doktorantkę temat jest ważny dla nauki oraz nowatorski. Doktorantka wykazała się znajomością literatury przedmiotu i potrafi ją twórczo wykorzystać. Pani Aleksandra Żal zna i prawidłowo stosuje właściwe metody badawcze, potrafi prawidłowo zaplanować, zorganizować i przeprowadzić badanie empiryczne, a następnie poprawnie zinterpretować jego wyniki.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest wartościowym osiągnięciem naukowym Doktorantki, stanowiącym oryginalny wkład do badań nad poznaniem wybranych właściwości biologicznych związków złota.

Praca w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka. Wnoszę, zatem do Wysokiej Rady Naukowej Rada Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie **Aleksandrze Żal** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. prof. Marcin Łukaszewicz

Handwritten signature of Marcin Łukaszewicz in black ink.