

Warszawa, 26.11.2018 r.

prof. dr hab. n. biol. Marcin Kruszewski  
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej  
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa  
e-mail: m.kruszewski@ichtj.waw.pl

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Żal

pt. „*Wybrane właściwości biologiczne aryloiloacetylenowych kompleksów  
złota (I) – próba identyfikacji zastosowań terapeutycznych*”

Nowotwory są jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się chorób cywilizacyjnych. Należąca do WHO Międzynarodowa Agencja ds. Badań nad Rakiem (IARC) szacuje, że w tym roku na choroby nowotworowe zachoruje 18,1 miliona osób, a 9,6 miliona osób umrze z powodu nowotworów. W roku 2012 było to odpowiednio 14,1 miliona oraz 8,2 miliona osób. Co piąty mężczyzna oraz co szósta kobieta zachorują na chorobę nowotworową w jakimś momencie swojego życia. Co ósmy mężczyzna i co jedenasta kobieta umrą z tego powodu. Liczbę osób, które żyją 5 lub więcej lat od postawienia diagnozy nowotworu ocenia się na całym świecie na 43,8 miliona. (Źródło: Puls Medycyny). Dane Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) wskazują niezbicie, że zachorowalność i umieralność na nowotwory gwałtownie wzrasta także w Polsce. Liczba zachorowań na nowotwory w Polsce w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła ponad dwukrotnie, osiągając w 2013 r. 156 tys., a liczba zgonów osiągnęła 98,9 tys. Prognoza Krajowej Rady Ludności z 2014 r. pokazuje, że w 2025 r. liczba zachorowań wyniesie 175 tys.

Wzrastające obciążenie chorobami nowotworowymi wynika z kilku czynników. Rośnie liczba ludności, społeczeństwa się starzeją, zmienia się częstość występowania niektórych przyczyn nowotworów związanych z rozwojem społecznym i gospodarczym. W szczególności dotyczy to szybko rozwijających się gospodarek, gdzie maleje częstość nowotworów związanych z ubóstwem i infekcjami, natomiast rośnie liczba zachorowań kojarzących się ze stylem życia typowym dla krajów uprzemysłowionych. Natomiast w Polsce za wysoką umieralność na nowotwory odpowiedzialna jest głównie niska skuteczność leczenia. Według danych KRN z 2013 r. w Polsce umiera 60% ludzi u których zdiagnozowano nowotwory. Średnia dla całego świata wynosi 50%, a w Europie gorzej mają tylko pacjenci w Chorwacji i na Węgrzech. Według szacunków przedstawionych przez Najwyższą Izbę Kontroli do 2025 r. nowotwory staną się główną przyczyną śmierci Polaków, wyprzedzając choroby serca. Z uwagi na powyższe,

problematyka naukowo-badawcza podjęta w przedstawionej do recenzji pracy, która miała na celu poszukiwanie nowych leków przeciwnowotworowych, dobrze wpisuje się w aktualne kierunki badań biomedycznych i ma duże znaczenie społeczne.

Rozprawa doktorska mgr A. Żal ma charakter badawczy i posiada układ edytorski typowy dla tego rodzaju monografii. Na rozprawę składa się: wstęp (17 str.), opis celów pracy, omówienie materiału i metodyki (14 str.), opis uzyskanych wyników (72 str.) i dyskusja (10 str.). Pracę uzupełniają wnioski, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz wykorzystanej literatury. Piśmiennictwo stanowi łącznie 140 pozycji, z których większość została opublikowana w latach 2000-2018, co świadczy o aktualnym wymiarze naukowo-badawczym przeprowadzonych badań. Jedynie we wstępie i opisie materiałów i metod przywoływane są starsze prace, co jest całkowicie zrozumiałe ze względu na opisowy charakter tych rozdziałów. Dobór piśmiennictwa jest odpowiedni dla treści pracy. Do przeglądu piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy oraz do dyskusji uzyskanych wyników badań własnych doktorantka wykorzystwała, poza trzema wyjątkami, publikacje opublikowane w języku angielskim. Jak to zwykle bywa przy takich spisach nie uchroniła się jednak przed pewnym nieładem i nieporządkiem, np. cytując większość prac z pełnymi nazwami czasopism, a niektóre skrótowo (np. poz. 1, 18, 26, 66, 78, 88, 90, 92, 96, 106 i kilka innych). W pozycji 39 brak jest nazwisk autorów. Błędy te, jak sądzę, wynikają z ułomności bazy danych oprogramowania do formatowania piśmiennictwa i mogą być łatwo usunięte w trakcie przygotowywania wyników do publikacji w czasopiśmie.

Wstęp rozprawy wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące terapeutycznych kompleksów złota, historii ich wykorzystania, własności fizyko-chemicznych, farmakokinetyki oraz mechanizmu działania leczniczego. Ponadto Autorka zamieściła rozdział poświęcony zjawisku oporności wielolekowej w kontekście działania auranofiliny. Wstęp jest ciekawy, a zamieszczone rysunki i schematy ułatwiają zrozumienie tekstu. Niestety czuję pewien niedosyt. Rozumiem ograniczenia narzucone przez chęć utrzymania równowagi pomiędzy poszczególnymi częściami rozprawy, jednak w rozdziale 1.4.2. "Generacja RFT i aktywacja szlaków sygnałowych prowadzących do apoptozy" Autorka poświęciła wiele uwagi indukcji apoptozy zależnej i niezależnej od kaspaz, niestety zabrakło w nim omówienia roli peroksydacji lipidów w tych procesach. A przecież na Ryc. 1.7. peroksydacja lipidów jest pokazana jako jeden z mechanizmów oddziaływania jonów metali wchodzących w skład kompleksów o właściwościach przeciwnowotworowych na główne procesy redoks w komórce. Zdaje sobie sprawę, że Rys. 1.6 opisujący apoptozę jest przedrukiem z publikacji, ale przecież można było uzupełnić go o własne przemyślenia. Główny produkt peroksydacji lipidów, 4-hydroksynonenal (4-HNE), w zależności od stężenia moduluje różne procesy komórkowe, m.in. szlaki sygnalizacyjne wrażliwe na stres



oksydacyjny, tj. Nrf2, AP-1, NF- $\kappa$ B, a także szlaki MAPK (p38, Erk, i JNK), Działanie 4-HNE w dużej mierze zależy stanu redoks komórki, w tym dostępności glutationu i aktywności transferaz glutationowych. Co więcej, 4-HNE hamuje aktywność reduktazy tioredoksyny i tioredoksyny, które były przedmiotem badań opisanych w ocenianej pracy.

Cele pracy zostały sformułowane przez doktorantkę jako rozdział 2. Autorka wymienia 4 cele pracy, chociaż sformułowanie „Zasadnicze cele niniejszej pracy” sugeruje, że były jeszcze jakieś inne. Jeśli tak, to prosiłbym o uchylenie rąbka tajemnicy. Cele pracy są dosyć zróżnicowane, od oceny właściwości antyproliferacyjnych nowo syntetyzowanych kompleksów złota, po weryfikację udziału białek oporności wielolekowej w eksporcie złota z krwinek. Świadczy to o wielowątkowości pracy. Nie ma w tym nic złego, dopóki określony jest zasadniczy cel główny przyświecający podjętym badaniom. Tego trochę zabrakło mi we wstępie pracy. Chociaż cele pracy są dobrze wyjaśnione, dotyczą jednak zagadnień bezpośrednio związanych z prowadzonymi badaniami, przydałoby się także króciutkie omówienie przesłanek leżących u podstaw podjętej tematyki badawczej. Pozostaje mi tylko mieć nadzieję, że moja ciekawość zostanie zaspokojona w czasie dyskusji podczas obrony doktoratu.

Analiza treści części pracy opisującej materiały i metodykę badań (podrozdziały 3.1 i 3.2 rozprawy) pozwoliła na weryfikację przydatności przyjętych metod badawczych do założonych celów pracy. Zbadano właściwości biologiczne aryloiloacetylenowych kompleksów złota opartych na szkielecie (1) benzoiloacetyleny, 17 związków; (2) etynyloferrocenu, 3 związki; (3) (antracenoilo)acetyleny, 2 związki i (4) (pirenoilo)acetyleny, 2 związki. Drugim ligandem były trifenylofosfina, trietylofosfina i andamatan. Badania wykonano na 3 liniach nowotworowych komórek ssaków (A549, HepG2 i SW620) oraz 3 szczepach drożdżaka *Candida albicans*. Badania na linii SW620 rozszerzono o panel podlinii (selektantów) uzyskanych przez dr. Andrzeja Błauza z Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego i różniących się opornością na wybrane chemioterapeutyki. W części pracy dotyczącej roli białek oporności wielolekowej przez błonowy transport złota użyto erytrocytów izolowanych z krwi obwodowej. Opis użytych materiałów i metod jest szczegółowy i w pełni wystarczający do realizacji założonych celów pracy i otrzymania opisanych wyników. Dobór materiałów i metod nie budzi moich zastrzeżeń, chociaż chętnie dowiedziałbym się czegoś więcej o panelu podlinii SW620, jeśli informacje takie są dostępne. Należałoby też użyć przynajmniej jeszcze jednej metody oceny proliferacji komórek, opartej na innym mechanizmie niż pomiar wnikania czerwieni neutralnej. Z uwagi na mnogość grup tiolowych w komórkach zwierzęcych chciałbym także zapytać się o specyficzność derywatyzacji glutationu za pomocą aldehydu o-ftalowego. Zabrakło mi także

opisu użytych metod statystycznych. Są one opisane przy niektórych rysunkach, ale zwyczajowo zamieszcza się też rozdział metody te podsumowujący.

Opis wyników zaczyna się od sekcji „Uzasadnienie wyboru modelu badawczego”, której miejsce powinno być raczej w części poświęconej materiałom i metodom, chociaż to tylko moje subiektywne odczucie. Zastanawia natomiast próba podziału badanych ligandów na te zawierające trifelynofosfine (1), te zawierające trietylofosfinę (2) oraz te zawierające ligandy ferrocenyloowe (3). Przy czym niektóre badane związki (np. DP300 i DP110) należą jednocześnie do grupy 2 i 3 (zawierają trietylofosfinę i rdzeń ferrocenowy. Ponieważ trifelynofosfina lub trietylofosfina powtarza się w większości ligandów, z punktu widzenia ewentualnej późniejszej analizy QSAR korzystniejszy byłby podział na pod kątem budowy ligandu aryloowego lub aryloilowego, tym bardziej, że to ligandy aryloowe (aryloilowego) są używane jako związki odniesienia, a nie fosfiny. Za takim podziałem przemawia też tytuł pracy.

Tym niemniej, zwraca uwagę ogrom pracy wykonanej przez doktorantkę. Już samo wyznaczenie krzywych przeżywalności dla 26 związków plus auranofina, plus jony Au na 8 liniach komórkowych przyprawia o zawrót głowy. Wyniki są spójne, szkoda tylko, że większość zsyntetyzowanych związków okazała się mniej toksyczna niż związek odniesienia (auranofina), ale tego nie można było przewidzieć bez przeprowadzenia doświadczeń.

Dyskusja jest ciekawa, ale dość oszczędna. Tym samym w moim odczuciu doktorantka zbyt mało uwagi poświęciła na dyskusję wyników badań własnych z doniesieniami literaturowymi, zwłaszcza iż tematyka pracy stanowi bardzo aktualny problem zdrowotny. Bardzo interesujący jest wątek dotyczący pro-oksydacyjnych właściwości badanych kompleksów, zwłaszcza kompleksów zawierających ferrocen (DP110, DP299 i DP300). Autorka dyskutuje aktywność pro-oksydacyjną badanych kompleksów w kontekście linii komórkowych, natomiast w moim odczuciu równie ciekawe byłoby porównanie w obrębie grupy podobnych kompleksów. Uwaga ta dotyczy nie tylko aktywności pro-oksydacyjnej kompleksów zawierających ferrocen, ale generalnie także innych obserwowanych efektów. Sądzę, że przy publikowaniu otrzymanych wyników będzie to konieczne. Jeśli nie pełna analiza QSAR, to przynajmniej próba wyjaśnienia obserwowanych zjawisk w kontekście budowy chemicznej zsyntetyzowanych związków. Wnioski z pracy sformułowane są poprawnie i odzwierciedlają wyniki prowadzonych badań.

Pomimo przedstawionych powyżej uwag nie mam zastrzeżeń co do strony merytorycznej pracy. Dobór metod i wykonanie doświadczeń są odpowiednie i świadczą o dobrym warsztacie naukowym doktorantki. Opisane niedociągnięcia są łatwe do poprawienia czy też uzupełnienia, co z kolei na pewno ułatwi publikację uzyskanych przez doktorantkę wyników badań własnych.



Z edytorskiego obowiązku mogę stwierdzić, że praca napisana jest poprawnie. Cieszy odpowiednie stosowanie znaku % i °, które powinny być stawiane po liczbach bez spacji, a ich oddzielanie spacją jest powszechnym błędem nie tylko w rozprawach doktorskich. Pod względem typograficznym uważam tę pracę jako jedną z lepszych jakie recenzowałem. Doktorantka nie uniknęła jednak potocznych, czy też niezręcznych sformułowań stylistycznych, antropomorfizacji itp., które będą wymagały przeformułowania jeśli wyniki miałyby być publikowane w języku polskim, np.: „Komórka, dążąc do zachowania równowagi pomiędzy procesami” (str. 12), „Do swoistych narzędzi regulujących poziom RFT należą enzymy: ... „ (ibidem), „Białka będące celem procesu degradacji proteosomalnej ...” i wiele innych. Doprecyzowania wymaga także sposób mineralizacji próbek „Wszystkie próbki (200 mm<sup>3</sup>) mineralizowano przez dodanie 133 mm<sup>3</sup> 30% w/o roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a następnie 333 mm<sup>3</sup> 65% w/o roztworu kwasu azotowego” (str 38). Nie jest też dla mnie jasna konwencja przyjęta przy opisie skrótów, zwłaszcza genów i białek, a także nazw chemicznych. Proponowałbym stosowanie do wszystkich genów/białek nazw i skrótów oraz konwencji zalecanej przez HGNC. Poza tym nie nazwałbym TXR i TXR2 izoformami białka, wydaje mi się, że są to dwa białka kodowane przez niezależne geny. Raczej są to izoenzymy. Niektóre nazwy związków chemicznych opisane są bardzo szczegółowo, np. kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazyno]etanosulfonowy (HEPES), a inne przy użyciu nazw potocznych/handlowych, np. doksorubicyna czy etopozyd. Ponadto ujednolicenia/uzupełnienia na etapie przygotowania publikacji wymaga również sposób formatowania piśmiennictwa.

Powyższe uwagi mają raczej charakter pomocniczy oraz redakcyjny, i nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Żal. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej mgr Żal i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Rozprawa spełnia wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Tym samym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Żal do dalszych etapów postępowania związanego z nadaniem stopnia naukowego doktora.



Marcin Kruszewski

