

Toruń, dnia 19 grudnia 2017 r.

dr hab. Renata Gadzala-Kopciuch, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Papaj
pt. „*Dostępność biologiczna i przemiany metaboliczne wybranych pochodnych genisteiny
wykazujących aktywność nowotworową*”
wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Bionieorganicznej i Biotechnologii Wydziału
Chemicznego Politechniki Śląskiej

Ocena wyboru tematyki badawczej

Obecnie wiele uwagi poświęca się poszukiwaniu zarówno nowych leków, jak i systemów ich dostarczania. Powinny one charakteryzować się wyższą aktywnością przekładającą się na skuteczne działanie przy zastosowaniu niższych stężeń oraz podwyższoną biodostępnością. *Zaprojektowane* w ten sposób potencjalne leki lub nośniki leków powinny wykazywać łatwość przenikania przez błonę komórkową, przez co mogą ułatwić transport substancji aktywnej do wnętrza komórki. Ma to ogromne znaczenie zwłaszcza w zakresie poprawy skuteczności leczenia antynowotworowego przy zastosowaniu tzw. terapii celowej (spersonalizowanej). Wymagania, jakie stawia się nowym lekami w początkowej fazie badań to nie tylko stabilność struktury, ale także np. zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Papaj, wykonana pod kierunkiem Pana Profesora Wiesława Szeji oraz Pani dr hab. Aleksandry Rusin, wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom. Praca eksperymentalna ukierunkowana jest na poszukiwanie syntetycznych związków - pochodnych genisteiny charakteryzujących się wyższą zdolnością hamowania proliferacji komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Bardzo ważnym etapem pracy było wykorzystanie uzyskanych wyników badań do określenia mechanizmu działania tych związków na poziomie molekularnym. Niewątpliwie jest to praca o charakterze interdyscyplinarnym z pogranicza chemii organicznej (uzyskanie pochodnych syntetycznych genisteiny), chemii analitycznej (opracowywanie metodyk analitycznych izolowania i oznaczania wybranych analitów) oraz biologii molekularnej (określenie metabolizmu i biodostępności genisteiny oraz jej syntetycznych pochodnych na poziomie komórkowym). Uznać należy, że dla młodego naukowca stanowi to ogromne wyzwanie, gdyż musi on spełnić wymagania nie tylko w obszarze dziedziny, w której ma uzyskać stopień naukowy, ale także posiadać wiedzę w dziedzinach pokrewnych, niezbędnych z punktu widzenia realizowanej tematyki badawczej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Opiniowana rozprawa doktorska liczy 229 stron, na którą składają się kolejno cel pracy, część literaturowa, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski, część eksperymentalna, bibliografia oraz suplement. Taki układ pracy jest dość dużym zaskoczeniem zwłaszcza dla prac z pogranicza chemii analitycznej. Pracę teoretyczną rozpoczyna cel pracy. Nie do końca jestem przekonana, co do poprawności jego sformułowania. Jest to raczej wprowadzenia połączone z celem pracy oraz podsumowaniem. Taki układ nie daje przejrzystości treści. Część teoretyczną Doktorantka poświęciła wyjaśnieniu zagadnień niezbędnych dla przeprowadzenia logicznego toku postępowania podczas omawiania i interpretacji wyników. Ten dział składa się z jednego głównego rozdziału (62 strony) podzielonego na siedem podrozdziałów. Pani mgr inż. Katarzyna Papaj omówiła bardzo szczegółowo budowę genisteiny (rozdział 2.1) i jej właściwości (rozdział 2.2), które zostały ukierunkowane na potencjalne działanie lecznicze (działanie przeciwnowotworowe). Kolejny rozdział (2.3) ujmuje dotychczasowe osiągnięcia związane z modyfikacją cząsteczki tego flawonu. To uporządkowanie wiedzy było niezbędne i bardzo przydatne w realizacji części eksperymentalnej związanej z modyfikacją genisteiny w celu uzyskania związków o ulepszonych właściwościach farmakologicznych (działających silniej i selektywniej wobec wybranego celu). Omówione zostały przemiany genisteiny w organizmie mające wpływ na biodostępność oraz absorpcję zwłaszcza z przewodu pokarmowego. Poznanie i zrozumienie procesów metabolicznych tego związku zachodzących w erytrocytach i wątrobie, to cenna informacja, że transport metabolitów do tkanek odbywa się w formie koniugatów. W kolejnych podrozdziałach (2.5; 2.6; 2.7) Doktorantka, w oparciu o aktualne doniesienia literaturowe, dokonała zestawienia metod stosowanych do oceny biodostępności (testy PAMPA oraz wykorzystanie linii komórkowej Caco-2) oraz przemian metabolicznych wybranych ksenobiotyków (chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas). W tym miejscu poruszona została problematyka związana z izolowaniem wybranych do badań związków podając przykłady głównie związane z możliwością zastosowania różnych sorbentów w ekstrakcji do faz stałej (SPE). Te studia literaturowe poszerzyły wiedzę Doktorantki w zakresie izolowania badanych analitów z wykorzystaniem tego typu ekstrakcji do przygotowania ciekłych próbek biologicznych. W praktyce umożliwiło to opracowanie metodyki wyodrębniania genisteiny i jej pochodnych z matryc biologicznych.

Po wnikliwym zapoznaniu się z całą pracą należy stwierdzić, że część literaturowa zawiera niezbędne informacje poparte aktualnymi osiągnięciami innych badaczy, które były niezbędne podczas interpretacji wyników i formułowania wniosków końcowych.

Przystępując do realizacji wybranej tematyki Pani mgr inż. Katarzyna Papaj postawiła hipotezę badawczą, że związki wykazujące podobieństwo strukturalne do genisteiny będą wykazywały wyższą zdolność do hamowania proliferacji komórek nowotworowych przy niższych stężeniach. Weryfikacja tej hipotezy wymagała zrealizowania poszczególnych celów pracy, które obejmowały: 1) przeprowadzenie

wyboru syntetycznych pochodnych genisteiny o wyższej zdolności hamowania proliferacji komórek nowotworowych niż genisteina, 2) ocenę biodostępności wybranych związków w badaniach *in vitro* i *in vivo*, 3) określenie mechanizmu działania na poziomie molekularnym. Tak sprecyzowane cele wymagały opracowania odrębnych procedur analitycznych do ilościowej analizy badanych związków izolowanych z osocza, moczu, pożywek pochodowlanych oraz drobnoustrojów z kału zwierzęcego (szczurów). Różnorodność i złożoność tych matryc niewątpliwie stanowiła wyzwanie dla Doktorantki, a opracowanie optymalnych parametrów ekstrakcyjnych wymagało nie tylko wiedzy, ale radzenia sobie z pojawiającymi się problemami. Muszę przyznać, że Pani mgr inż. Katarzyna Papaj wykazała się profesjonalizmem, gdyż podczas pojawiania się nieprzewidzianych sytuacji radziła sobie bardzo dobrze starając znaleźć właściwą odpowiedź i rozwiązania napotykanym problemom.

Zastosowane metody i techniki analityczne pozwoliły na przeprowadzenie pogłębionych badań ilościowych. Podejście takie umożliwiło szczegółową charakterystykę badanych zjawisk i ich interpretację. Uzyskane podczas przeprowadzonych eksperymentów wyniki poddane zostały Stwierdzam, że wiedza teoretyczna Autorki oraz wybrane przez Nią metody badawcze umożliwiły realizację poszczególnych zadań i rozwiązanie postawionego problemu.

Uwagi szczegółowe

Uważna lektura recenzowanej dysertacji nasunęła mi pewne spostrzeżenia, które pragnę polecić uwadze Autorki:

- str. 94 – Termin „przygotowanie próbki” wiąże się raczej z metodami izolowania analitów poprzez np. ekstrakcję, a nie z czynnością oczyszczania ekstraktów z wykorzystaniem filtrów membranowych nylonowych czy teflonowych. Materiał, z którego wykonana jest membrana powinien być obojętny dla filtrowanej próbki.
- Str. 72 - Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem, że: „w celu zwiększenia współczynnika retencji i poprawienia kształtu pików składniki fazy ruchomej zakwasza się stosując dodatek kwasu mrówkowego lub octowego”. W przypadku zastosowania spektrometrii mas dodatek kwasów jest głównie stosowany do podwyższenia sprawności jonizacji, czyli zwiększenia intensywności sygnału. Inaczej jest w przypadku, gdy wykorzystywana jest chromatografia cieczowa z detektorem spektrofotometrycznym czy fluorymetrycznym. Najlepszym przykładem niekonsekwencji Autorki jest zamieszczone na stronie następnej (str. 73) zaprzeczenie powyższego stwierdzenia: „gorszą symetrię pików obserwowano również po dodaniu kwasu octowego do fazy ruchomej”.
- Str. 74 – Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w rozdziale *Omówienie wyników* pojawia się opis warunków analizy chromatograficznej. Informacje te powinny znaleźć się w *Części eksperymentalnej* (Rozdział 5).
- Str. 76 – Co oznacza podpis pod rysunkiem 19: „skokowe zmiany energii źdźrzeń genisteiny”. Którego z rysunków to dotyczy: górnego czy dolnego?
- Str. 79 – Co oznaczają opisy „Grupa I-VP” w tabeli 4.

- Str. 80 - Pod tabelą 5 umieszczono skład fazy ruchomej, jednak nie do końca wiadomo co jest składnikiem A , a co składnikiem B .
- Str. 82 – Na jakiej podstawie Autorka twierdzi, że „niezidentyfikowane piki pochodzą od składników buforu”? Czy określono selektywność i specyficzność zastosowanej metody analitycznej?
- Str. 83 - W tabeli 6 brakuje parametrów statystycznych dla a i b wyznaczonych zależności liniowych. Czy są one akceptowalne?
- Str. 87 – Stwierdzenie „opracowana metoda nie służyła do określenia dokładnego stężenia danego związku w próbce, a jedynie do określenia stosunku zawartości związku w próbce po przeprowadzonym eksperymencie biologicznym do ilości związku w roztworze wykorzystywanym do badań” jest dla mnie do końca zrozumiałe. Jak można wyznaczać np. efekt matrycowy nie analizując tego ilościowo? Przecież w drugiej części zdania pojawia się „ilość związku”. Jak weryfikowano poprawność uzyskiwanych sygnałów?
- Str. 90 – Proszę o wyjaśnienie, dlaczego przy wyznaczaniu parametrów metody analitycznej posługiwano się jednostkami ng/ml a przy określaniu stabilności stężeniami wyrażonymi w μM .
- Wyjaśnienia wymagają ujemne wartości błędu względnego zamieszczone w tabeli 7 (str. 85), tabela 8 (str. 88), tabela 9 (str. 90) oraz wzór 5 (str. 167) do obliczenia tych wartości.
- Str. 92 – Podany numer rozdziału 5.8.3 jest nieprawidłowy. Powinien być przytoczony rozdział 5.9.1. Czym kierowała się Doktorantka dokonując wyboru filtrów membranowych stosowanych do filtracji próbek? Czy wartość utracona nie wynikała z objętości martwej tych filtrów?
- Str. 96, Tabela 12 – Dlaczego wartości odzysku są wyższe dla jednokrotnej elucji i wynoszą 89,2 %, a dla tego samego składu mieszaniny (45/45/10 % v/v/v acetonitryl/aceton/0,1 % kwas mrówkowy) zastosowanej dwukrotnie uzyskano 87,6 %? Identyczna sytuacja powtarza się dla składu 40/40/20 % v/v/v acetonitryl/aceton/0,1 % kwas mrówkowy.
- Str. 97, Tabela 14 – Na jakiej podstawie dokonano wyboru stężeń do badania odzysku wybranych związków z próbek osocza i moczu stosując jako metodę przygotowania próbki ekstrakcję do fazy stałej? W tabeli 16 są to jeszcze wyższe wartości stężeń (brakuje litery „l” przy ml). Czy niskie wartości odzysku nie mogą być wynikiem zbyt małej ilości zastosowanego sorbentu?
- Str. 101 – „Współczynnik retencji masy” – to nie do końca wyjaśniony parametr, tym bardziej, że oznaczenie R wyrażone w procentach Doktorantka stosuje do wyrażania odzysku.
- Str. 102 – Co Autorka miała na myśli używając wyrazów „warunki sink”. Czy podczas przeprowadzanych testów PAMPA cząsteczki przechodzące przez membranę są szybko usuwane, dzięki czemu cały czas utrzymuje się wysoki gradient stężeń (tzw. sink state). Czy może był to model DSPAMPA (ang. double sink PAMPA) zapewniający

lepsze odzwierciedlenie warunków fizjologicznych, w którym błona zbudowana jest z 20% mieszaniny fosfolipidów?

- Str. 104 – Zbyt pobieżnie przeprowadzono interpretację wyników zamieszczonych na wykresach 2 i 3.

W pracy można odnaleźć wiele przykładów używania spolszczonych wyrazów anglojęzycznych nie do końca znajdujących odzwierciedlenie w obowiązującej nomenklaturze analitycznej, np.: *koncentracja* (str. 8), *zamodelowano* (str. 9), *kosolwentów* (str. 33), *masa molekularna* (str. 100) oraz *rozdział chromatograficzny* (str. 72), *skażenie optyki jonowej* (str. 78), *wrażliwości* (w odniesieniu do metody, str. 78), *metoda MRM* (str. 77), *izolacja* (str. 43, 95, 173), *end-capping* str. 162), *objętość wstrzykiwana*, *wstrzyknięto* (str. 172), *inserty* (str. 185), itp.

Ocena końcowa

Na podstawie przeprowadzonej powyżej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Papaj jest dowodem doskonałej znajomości podjętej problematyki badawczej oraz stanowi samodzielne i oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę problemu badawczego. Autorka wykazała się szeroką wiedzą i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań na pograniczu chemii oraz biologii. Przedstawiona w pracy tematyka badawcza jest nowatorska, interesująca i aktualna, a wykorzystane metody badawcze zostały dobrane w sposób właściwy, co umożliwiło skuteczną realizację wytyczonych celów. Obszerna dyskusja napisana jest w sposób przekonujący, wymaga jednak od czytelnika ogromu uwagi biorąc pod uwagę znaczną ilość różnorodnych wyników i obserwacji. Poprawne konstruowanie wniosków świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego. Pragnę podkreślić, że wywiązanie się z postawionych celów i ich zrealizowanie wymagało od Autorki poszerzonej wiedzy z zakresu określenia biodostępności i metabolizmu w warunkach *in vitro* i *in vivo* genisteiny i jej syntetycznych pochodnych.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania sformułowane w artykule 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. 595 z późniejszymi zmianami), dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Papaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

R. Gadoła - Kopciuch