

Sosnowiec, 28.06.2015

Prof. dr hab. n. farm. Anna Sułkowska
Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Śląski Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Katarzyny Majzner
„Spektroskopia oscylacyjna w farmakologii śródbłonka”
na stopień doktora nauk chemicznych

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa napisana została pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej oraz prof. dr hab. Stefana Chłopickiego. Tematem pracy doktorskiej mgr Katarzyny Majzner jest opracowanie metodyki oceny wewnątrzkomórkowych zmian biochemicznych w pojedynczej komórce śródbłonka.

Praca doktorska mgr Katarzyny Majzner składa się z Części teoretycznej (35 stron), Celu pracy (2 strony), Części eksperymentalnej (50 stron), Podsumowania (1 strona), Wniosków (2 strony), Spisu 134 pozycji Literatury oraz Spisu dorobku naukowego Doktorantki. Załączono także 6 publikacji współautorstwa Doktorantki, bezpośrednio związanych z recenzowaną przeze mnie pracą doktorską, o łącznym współczynniku oddziaływania IF 22.89, z których dwie zostały zacytowane w rozprawie doktorskiej pod numerem [92] i [125].

W Części teoretycznej mgr Katarzyna Majzner opisała podstawy spektroskopii ramanowskiej, w tym mapowania ramanowskiego, przedstawiła metody analizy widm, zarówno standardowe, jak i chemometryczne. Przedstawiła także problemy doboru odpowiedniej analizy widm tak skomplikowanych obiektów jak struktury wewnątrzkomórkowe komórki.

W osobnym podrozdziale opisała zastosowanie spektroskopii ramanowskiej do badań biomedycznych, możliwości jej wykorzystania w połączeniu z mikroskopią i zalety

konfokalnego spektrometru ramanowskiego do opisu zmian biochemicznych w pojedynczej komórce.

W kolejnym podpunkcie Części teoretycznej Doktorantka opisuje budowę komórki oraz podaje jej charakterystykę spektralną w Tabeli I za [45] (Applied Spectroscopy Review 2007), zaznaczając optymistycznie, że „można stosunkowo łatwo przypisać poszczególne pasma do związków takich jak lipidy, białka i kwasy nukleinowe”. Opisuje także krótko cytometrię obrazową - metodę referencyjną stosowaną przez nią dla spektroskopii ramanowskiej. Następnie Autorka przedstawia funkcje śródbłonna oraz budowę kropli lipidowych. Identyfikacja wielu białek związanych z kroplami lipidowymi wskazuje, że poza magazynowaniem i metabolizmem tłuszczów, uczestniczą w innych procesach komórkowych. Spektroskopia ramanowska dostarcza nie tylko informacji na temat składu biochemicznego kropli lipidowych, ale także dystrybucji składników biochemicznych, co wykorzystała Doktorantka w swojej pracy.

Kolejny podrozdział tej części przynosi wiadomości o daunorubicynie (DNR), doksorubicynie (DOX) - lekach z grupy antracyklin o działaniu cytostatycznym oraz ich epimerach - epidoksorubicynę (EDOX) i epidaunorubicynę (EDNR).

Największą wadą stosowanych dotychczas antracyklin jest ich wysoka toksyczność, w szczególności groźna dla życia pacjentów - kardiotoxyczność. Z tego powodu antracykliny stanowią grupę związków nadal intensywnie badanych. Poszukuje się pochodnych o wyższej i/lub zachowanej aktywności cytotoxycznej oraz znacznie obniżonej toksyczności. Autorka wskazała, że niewielkie różnice w budowie chemicznej warunkują aktywność i cytotoxyczność badanych przez nią antracyklin.

Daunorubicyna (DNR) wycofana ze względu na znaczne powikłania kliniczne. Epimery DOX i DNR - EDOX i EDNR wykazują znacznie mniej skutków ubocznych przy jednocześnie porównywalnym efekcie terapeutycznym. Autorka opisuje przypuszczalne mechanizmy działania badanych antybiotyków antracyklinowych: interkalacja do DNA, hamowanie enzymów syntezy DNA - topoizomerazy I i II oraz tworzenie wolnych rodników uszkadzających DNA i prowadzących do peroksydacji lipidów.

Autorka przedstawiła przypuszczalny mechanizm kardiotoxycznego działania antracyklin

Dobrze, że zwróciła uwagę, że dla niskich stężeń DOX interkalacja do DNA ma nieznaczny wpływ na konformację DNA.

Autorka cytuje prace , w których spektroskopia ramanowska została wykorzystana do wyjaśnienia mechanizmu interkalacji komórka-antracyklina.

Autorka przytacza pracę Guo et. z 2009 r opisującą zmiany w widmach ramanowskich hepatocytów powodowane wzrastającym stężeniem dokсорubicyny w układzie, wskazujące na interkalację DOX z DNA za pomocą wiązań wodorowych w pozycji N7 guaniny.

Czy jednak antracykliny interkalują między pary zasad azotowych, jest dyskusyjne. Kwestionują to prace między innymi A.G.Patel.

Kwestionują mechanizm interkalacji i wytwarzania wolnych rodników jako istotny klinicznie, gdyż do wystąpienia tych efektów stężenie dokсорubicyny musiałoby być znacznie wyższe niż to stosowane przez pacjentów. Twierdzą, że dokсорubicyna pobudza syntezę lipidu-ceramidu, który powoduje aktywację transkrypcyjnego prekursora CREB3L1 . DOX stymuluje proteolityczny rozkład tego prekursora powodując przy tym zablokowanie mnożenia się komórek rakowych.

Stres oksydacyjny, którego efektem jest nasilona obecność reaktywnych form tlenu oraz zaburzeniem mechanizmów antyoksydacyjnych, jest jednocześnie jedną z przyczyn zwiększonej produkcji tłuszczu nienasyconych w okolicy jądra komórkowego.

Nie poznano jeszcze do końca wszystkich mechanizmów łączących hiperglikemię z zaburzeniami budowy i funkcji i ściany naczyniowej. Wiadomo jednak, że hiperglikemia odgrywa szczególną rolę w wytwarzaniu stresu oksydacyjnego [Ceriello et al. 2000].

W rozdziale Cel pracy Doktorantka przedstawiła założenia swoich badań wykorzystujących technikę mapowania ramanowskiego do oceny wewnątrzkomórkowych zmian biochemicznych w pojedynczej komórce śródbłonka. Założyła, że obserwacja mechanizmów odpowiedzi śródbłonka na stymulację lekami z grupy antracyklin (DOX, DNR, EDOX i EDNR) oraz stresem oksydacyjnym spowodowanym inkubacją w glukozie, jak również tworzenia kropli lipidowych wywołane stymulacją kwasem arachidonowym, że ta obserwacja wyjaśni zmiany biochemiczne w komórkach śródbłonka i rolę ciałek lipidowych,

W części Materiały i metody Autorka opisała metody (hodowla komórkowa, oznaczanie uwalnianej prostacykliny) i techniki (opis spektrometru ramanowskiego wyposażonego w mikroskop konfokalny, mikroskop sił atomowych).

Doktorantka przytłoczona odpowiedzialnością za niezwykle trudny eksperyment straciła czujność w jego opisywaniu. Umknęło Jej uwadze brak podrozdziału „Odczynniki”, czyli

Materiały. Tam znalazłyby się dane o producentach leków (DOX, DNR, EDOX i EDNR). Czytelnik dowiedziałby się, czy stosowano substancje czynne zakupione, czy też oczyszczone z preparatu leczniczego.

Mgr Katarzyna Majzner ułatwiła sobie nieco opisywanie wyników i ich dyskusję jednocząc te dwa rozdziały w jeden Rozdział - Wyniki i dyskusja.

Autorka przedstawiła metodykę, która wykorzystuje spektroskopię Ramana (mapowanie ramanowskie) do analizy zawartości antracyklin w jądrze komórki śródbłonka ludzkiego pozyskanej z żyły pępowinowej linii EA.hy926. Wykazała, że DNR (wycofana z zastosowań klinicznych) najsilniej kumuluje się w jądrze komórkowym przy niższych stężeniach niż DOX, EDOX, EDNR. Zaobserwowała stres oksydacyjny w siateczce endoplazmatycznej dla wysokich stężeń wszystkich badanych antracyklin.

Wdrożenie spektroskopii Ramana jako metody diagnostycznej przyspieszyłoby badania, a co za tym idzie, umożliwiło zbadanie większej liczby pacjentów w tym samym czasie, obniżyłoby koszty, a w przypadku niektórych chorób polepszyło jakość życia pacjenta poprzez uniknięcie bolesnych badań.

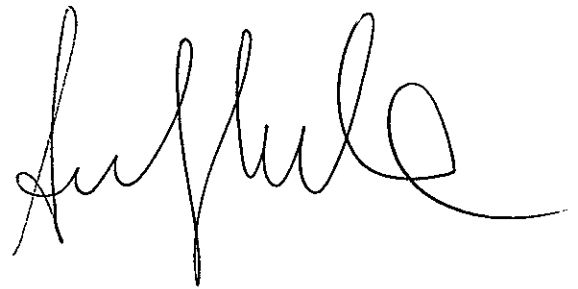
Mimo, że badania śródbłonka za pomocą techniki spektroskopii ramanowskiej są prekursorskie i rozwijane przez zespoły naukowe prof. Małgorzaty Barańskiej i prof. Stefana Chłopickiego, to wiele traci praca pozbawiona dyskusji z publikacjami innych autorów, nawet jeśli badania swoje prowadzili stosując inne techniki.

Półstronicowe podsumowanie kończy część eksperymentalną. Spis literatury zawiera 134 prace, w tym 7 prac, w których współautorami są promotorzy Doktorantki. Mgr Katarzyna Majzner przedstawia dalej swój bogaty dorobek naukowy, tj. 14 prac oryginalnych, w tym 1 krajowa i 1 podręcznik, w którym to dorobku wyodrębnia 6 pozycji bezpośrednio związanych z tezami rozprawy doktorskiej. Tym bardziej brakuje szerokiego całościowego omówienia eksperymentów opisanych i ocenionych przez recenzentów czasopism indywidualnie dla każdej pracy na tle stanu wiedzy i możliwości eksperymentatorskich innych ośrodków. Te uwagi jednak dotyczą Doktorantki tylko dlatego, że posiada ona już niezaprzeczalnie duży jak na osobę, która dopiero wchodzi w życie naukowe, dorobek. Gdyby nie to, nie byłoby powodu, aby recenzent doktoratu życzył sobie omówienia DOROBKU doktoranta a nie tylko wyników pracy, na tle prac innych naukowców.

Po dogłębnym zapoznaniu się z treścią przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Majzner stwierdzam, że jest pracą wartościową i bogatą w nowe elementy poznawcze. W pełni odpowiada ona wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami). Ma ona charakter naukowy i aplikacyjny.

Ponadto, biorąc pod uwagę nowatorskie podejście do podjętego tematu, ważne nie tylko z naukowego, ale także aplikacyjnego punktu widzenia, potwierdzone współautorstwem w 6 publikacjach w renomowanych czasopismach o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF 22.89, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Majzner, jeśli pozostałe kryteria nie stoją na przeszkodzie. Głównym argumentem przemawiającym za wyróżnieniem tej pracy jest nie tylko odważne podjęcie przez mgr Katarzynę Majzner próby zastosowania spektroskopii ramanowskiej do celów diagnostycznych, ale podjęcie jej z sukcesem, co być może zostanie w przyszłości wykorzystane w praktyce.

Przedkładam Panu Dziekanowi oraz Wysokiej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Majzner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'K. Majzner', written in a cursive style.