

*Prof. dr hab. Krzysztof Rolka*  
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk  
tel. +48-58-5235088  
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

---

**Ocena pracy doktorskiej mgr Aleksandry Banaszczyk  
p.t. „Kompleksy platyny(II) z ligandami receptorów tachykininowych”**

Odkrycie w latach 60. ubiegłego wieku przez Rosenberga i współpracowników właściwości przeciwnowotworowych *cis*-diamminodichloroplatyny(II) było wielkim osiągnięciem w chemioterapii. Równoległe z pracami nad nowymi sposobami jej podania, także w skojarzeniu z innymi chemioterapeutykami, prowadzone są bardzo intensywne badania nad opracowaniem analogów tego związku o mniejszej toksyczności i lepszych właściwościach terapeutycznych. W ich wyniku, platyna jest najlepiej poznanym metalem pod względem reaktywności do DNA, a do hasła „*cisplatin*” w bazie PubMed znajduje się ponad 67 tys. odwołań. Mimo to w praktyce medycznej znalazło zastosowanie jedynie kilka kompleksów platyny. Fakt ten niezbitnie dowodzi jak niezwykle trudnym zadaniem jest opracowanie nowego chemioterapeutyku o właściwościach wyraźnie lepszych niż *cisplatin*. Projektowanie i chemiczna synteza kompleksów platyny(II) z peptydami o właściwościach cytostatycznych stanowi od lat jeden z tematów badawczych prof. dr hab. Aleksandry Misickiej-Kęsik, promotorki recenzowanej rozprawy. W nurt tych badań wpisuje się rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Banaszczyk. Zadanie jakie przed nią postawiono to chemiczna synteza i charakterystyka kompleksów platyny(II) z peptydami o powinowactwie do receptorów tachykininowych. Temat dysertacji oceniam jako jest ambitny, bez wątplenia leży w głównym nurcie współczesnej chemii medycznej. O trudnościach w realizacji zadań rozprawy, zarówno na etapie projektowania związków chemicznych o potencjalnych właściwościach cytostatycznych, jak i syntetycznych przekonuje lektura recenzowanej rozprawy.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 156 stron tekstu, a jej układ jest typowy dla tego typu opracowań. Zasadnicze rozdziały pracy, poprzedzone streszczeniem w języku angielskim i wykazem skrótów, to: Część literaturowa (57 stron), Założenia i cel pracy (4 strony), Badania Własne (31 stron), Podsumowanie i wnioski (5 stron), Część Eksperymentalna (38 stron), Literatura cytowana (182 pozycje). Proporcje pomiędzy przeglądem literaturowym a dyskusją uzyskanych wyników i opisem eksperymentów wykonanych przez Kandydatkę uważam za odpowiednie.

Zagadnienia omawiane w rozdziale „Część literaturowa” nawiązują bezpośrednio do badań własnych Doktorantki, dzięki temu bardzo dobrze wprowadzają w problematykę rozprawy. W pierwszej części rozdziału Kandydatka omawia mechanizm działania farmaceutyków zawierających Pt(II). Apoptoza komórek nowotworowych następuje na skutek uszkodzenia DNA w wyniku tworzenia wiązań koordynacyjnych pomiędzy atomami Pt(II) i atomami azotu zasad purynowych. Pożądaný efekt terapeutyczny uzyskuje się mimo niewielkiej biodostępności, niespecyficznych oddziaływań z białkami i peptydami gospodarza oraz aktywowanych mechanizmów naprawczych DNA prowadzących do rozwoju lekooporności. Następnie mgr Banaszczyk przechodzi do zwięzłej charakterystyki kolejnych generacji chemioterapeutyków wywodzących się z cisplatyny, sposobów ich administracji, a także wywoływanych przez nie efektów ubocznych (między innymi nefrotoksyczność, neurotoksyczność, ototoksyczność, zaburzenia w funkcjonowaniu układu hematologicznego). W kolejnym fragmencie rozdziału Doktorantka skupia się na zagadnieniach wykorzystania ligandów peptydowych w projektowaniu terapeutyków platynowych o zwiększonej selektywności w stosunku do wybranych komórek nowotworowych oraz charakterystyce kompleksów metali (rutenu(III), miedzi(II), złota(III), srebra(I)) o aktywności przeciwdrobnoustrojowej lub cytotoksycznej. W sposób znacznie bardziej szczegółowy, co zrozumiałe w kontekście problematyki rozprawy, Kandydatka scharakteryzowała kompleksy Pt(II) z peptydami, metody ich syntezy oraz analizy. Rozdział ten kończy syntetyczną charakterystyką receptorów tachykininowych oraz ich agonów. Nie mam zastrzeżeń do poziomu merytorycznego i redakcji tego rozdziału oraz doboru teksów źródłowych. Autorka przekonuje, że potrafi redagować tekst naukowy. Rozdział jest wielowątkowy, stąd niektóre z zagadnień przedstawione zostały w sposób syntetyczny; stanowią jednak dobre wprowadzenie w problematykę badań własnych. Dostrzeżone niedociągnięcia są niewielkie. Z obowiązku recenzenta wymienię kilka: niefortunne sformułowania (reszta kwasu karboksylowego seryny, str. 11; stosunek aktywnej cząsteczki do lipidowego płaszcza, str. 27; mostek disiarczkowy, str. 58), mało czytelny rys. 5, określenia *antagonista/antagoniści* proponuję zmienić na

*antagon/antagony*, w hamowaniu aktywności cyklooksygenazy nie pośredniczy receptor (str. 33), opis syntezy peptydów zawierających reszty glukozy (str. 45) zawiera, jak na część literaturową, zbyt dużo szczegółów. W opisie tachykinin (str. 48, 49) nie pojawia się informacja, że przedstawiono tylko te wyodrębnione z organizmów ssaków, w istocie rodzina ta jest znacznie liczniejsza. Zdanie na str. 53 (wiersz 9d) rozpoczynające się od słów „*Biorąc pod uwagę opisane procesy.....*” wymaga przerezegowania.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była chemiczna synteza serii kompleksów platyny(II) z peptydami o sekwencjach wywiedzionych ze struktur fragmentów i syntetycznych analogów peptydowych agonów receptorów tachykininowych. W założeniu, obecność ligandów peptydowych w kompleksach o aktywności cytotoksycznej miała na celu zwiększenie ich selektywności do komórek nowotworowych, w których obserwowana jest nadekspresja tych receptorów. Jednym z zadań badawczych była synteza C-końcowego heksapeptydu substancji P zawierającego atomy  $^3\text{H}$  w pozycjach *para* pierścieni benzenowych reszt Phe. Zaplanowane zadania badawcze oceniam jako ambitne, ich realizacja wymagała od Kandydatki bardzo dobrego opanowania technik syntetycznych i analitycznych. Zagadnienie syntezy kompleksów Pt(II) z peptydami to temat od kilku lat rozwijany w pracowni Promotorki rozprawy. Możliwość konsultacji z osobami mającymi doświadczenie w problematyce planowanych badań, bez wątplenia ułatwiły Doktorantce ich podjęcie. Nie obniża to jednak mojej wysokiej oceny koncepcji badań, jak i udziału mgr Banaszczyk w ich realizacji.

W kolejnym rozdziale rozprawy zatytułowanym „Badania własne” Kandydatka omawia uzyskane wyniki. Pierwszym realizowanym zadaniem badawczym była synteza heksapeptydu znakowanego trytem. Badania te Doktorantka realizowała w laboratorium prof. Gezy Totha w Centrum Biomedycznym Węgierskiej Akademii Nauk. Synteza zakończyła się sukcesem, jednak z uwagi na niespecyficzne wiązanie się peptydu z receptorami tachykininowymi, zarzucono plany jego wykorzystania do syntezy i śledzenia dystrybucji w tkankach kompleksów platyny. Szkoda, że w pracy znajduje się jedynie krótka informacja o wynikach badań biologicznych. Realizując cel rozprawy, Doktorantka otrzymała 18 kompleksów platyny(II) z peptydami (zawierającymi 5 – 7 reszt aminokwasowych), których sekwencje wywiedziono ze struktur pierwszorzędowych agonów receptorów tachykininowych, dołączając do każdej z nich na N-końcu aminokwas (His, Met, Thr, Ser, Glu lub Dap) umożliwiającą tworzenie wiązań koordynacyjnych z Pt(II), a w wypadku trzech zawierających resztę glukozy – dodatkowo Lys. Uzasadnienie wyboru sekwencji nie budzi zastrzeżeń. Charakterystykę syntetyzowanych kompleksów Kandydatka prowadziła metodą spektrometrii mas, a dla

wybranych związków, ramach współpracy z grupą prof. Wiktora Koźmińskiego, także metodą magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  NMR i  $^{195}\text{Pt}$  NMR). Prezentowane wyniki przekonują, że Doktorantka otrzymała zaplanowane kompleksy platyny. Pewien niedosyt budzi niezamieszczanie w rozprawie chromatogramów analiz HPLC oraz widm MS. Doktorantka zwracała uwagę na problemy, jakie napotkała podczas oczyszczania związków. Możliwość weryfikacji czystości syntetyzowanych kompleksów, pozwoliłaby więc na ocenę skale trudności tych analiz. Dyskusja oceny aktywności cytotoksycznej syntetyzowanych kompleksów Pt(II) na dwóch wybranych liniach komórek nowotworowych (SEGA i T-98G stanowi ostatni fragment dysertacji. Badania te przeprowadzone zostały w grupie prof. Andrzeja Lipkowskiego w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Niestety badane związki nie hamowały proliferacji komórek linii eksperymentalnych. Doktorantka uzasadnia to niską rozpuszczalnością badanych kompleksów, a w wypadku związków zawierających resztę glukozy – zbyt silnym wiązaniem platyny do ligandów peptydowych, uniemożliwiającym tworzenie adduktów z docelowym DNA. To oczywiście z punktu widzenia celu rozprawy oraz nakładu pracy Kandydatki wynik rozczarowujący. Nie oceniałbym go jednak w kategorii porażki. Taka jest po prostu specyfika badań naukowych. Osiągnięcie założonego celu jest zawsze niepewne, a prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu maleje wraz ze stopniem złożoności problemu, z jakim mierzy się badacz. Redakcja tego fragmentu dysertacji jest na dobrym poziomie. Autorka jasno formułuje swoje myśli, chociaż niektóre ze zdań wymagałyby przeredagowania, np. to na str. 69 rozpoczynające się od „*Interpretacje obserwacji...*”. Tabela 7 (str. 54) i tabela 2 (str. 71) są identyczne; HOBt nie jest czynnikiem sprzęgającym (str. 67); określenie „*ilość*” odnosi się to rzeczowników niepoliczalnych, a więc powinno być np. „*liczba pików*” a nie „*ilość pików*” (np. str. 77).

Opisy wykonywanych eksperymentów oraz charakterystyka fizykochemiczna syntetyzowanych związków zawarta jest w kolejnym rozdziale zatytułowanym „Część eksperymentalna”. Nie mam zastrzeżeń do doboru metod syntetycznych i analitycznych. Zgodnie z założonym planem badawczym, Kandydatka otrzymała (manualnie) 18 peptydów na drodze syntezy chemicznej na nośniku stałym. W kolejnym etapie utworzyła w roztworze lub na nośniku stałym (w trzech wypadkach) ich kompleksy z platyną(II), następnie oczyściła za pomocą HPLC w układzie faz odwróconych. Końcowe produkty scharakteryzowała, podając czasy retencji a wyznaczone wartości m/z potwierdziły, że otrzymała zaplanowane związki. Nie mam zastrzeżeń do strony merytorycznej tej części pracy. Mam natomiast uwagi do strony redakcyjnej. Wszystkie syntetyzowane kompleksy peptydów otrzymano stosując te same metody. Zamiast więc wielokrotnego powtarzania tych samych opisów, sugerowałbym podanie

jednego, a ich analizy fizykochemiczne mogłyby być zestawione w tabeli. W tym rozdziale Autorka nie ponumerowała związków, co nieco utrudnia lekturę. W języku polskim dziesiąte części oddziela się przecinkiem a nie kropką. Niektóre z wartości czasów retencji różnią się od tych podanych w tabeli 4 (str. 75). Na str. 114 i 115 podanym wartościom przesunięć chemicznych nie towarzyszy ich przypisanie konkretnym protonom. Podczas tworzenia kompleksów, produkty końcowe ulegały wytrąceniu, odsączone i suszone. Według powtarzających się opisów, w kolejnym etapie „przesącz liofilizowano z wody”. Proszę o uzasadnienie tej czynności.

Na podstawie lektury rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Banaszczyk, stwierdzam, że jest Ona dobrze wykształconym chemikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej, tym samym jest przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Temat podjęty przez Doktorantkę jest aktualny z punktu widzenia naukowego i aplikacyjnego. Wysoko oceniam poziom merytoryczny i zakres badań wykonanych przez Doktorantkę. Przeprowadzone eksperymenty wymagały od Kandydatki biegłości w posługiwaniu się technikami syntetycznymi i analitycznymi nowoczesnej chemii organicznej, a także podczas realizacji zdań badawczych, umiejętności współpracy z innymi grupami. Kandydatka przygotowała interesującą rozprawę doktorską, chociaż wyniki przez Nią uzyskane nie były zgodne z oczekiwaniem. Jak już podkreślałem, faktu tego nie można interpretować w kategoriach niepowodzenia Doktoranta. Moje uwagi krytyczne i sugestie odnoszą się głównie do strony formalnej. Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2016, poz. 882), rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego: w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 26 września 2016 r. (Dz. U. poz. 1586) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Banaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, dnia 13 marca 2018 roku

