



dr hab. inż. Łukasz Górski, prof. PW

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-7921; fax: 022-234-5631, e-mail: lukegor@ch.pw.edu.pl

Warszawa, 2020-01-27

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Janiszek

pt: *„Elektrochemiczne badania oddziaływań plazmidowego DNA z substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwutleniających”*

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Dominiki Janiszek pt. *„Elektrochemiczne badania oddziaływań plazmidowego DNA z substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwutleniających”* wykonana została na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, funkcję promotora pełni prof. dr hab. Paweł Kulesza, promotorem pomocniczym jest dr Hanna Majewska - Elżanowska.

DNA jest celem farmakologicznym wielu leków, które są obecnie stosowane lub pozostają w fazie badań klinicznych. Tworzenie przez nie kompleksów z DNA umożliwia wpływ na funkcjonowanie komórek poprzez modulowanie ekspresji genów lub zakłócanie replikacji. Opracowano wiele strategii w celu wykorzystania znanej struktury DNA do specyficznego wiązania leku. Jednym z podejść jest użycie małych cząsteczek, które są w stanie rozpoznać konkretne, unikalne dla DNA obszary i związać się z nimi. Projektowanie nowych leków jest złożonym zadaniem, wymagającym wieloetapowych i kosztownych badań. Nie ma jednej techniki eksperymentalnej, która pozwalałaby w pełni określić sposób oddziaływania danego związku z kwasami nukleinami, dlatego opracowano wiele podejść w celu wyjaśnienia interakcji między lekami a DNA. Skuteczne projektowanie leków wymaga wystarczająco jasnego i szczegółowego obrazu interakcji między lekiem a DNA, który można otrzymać jedynie poprzez połączenie informacji z różnych źródeł. Przedłożona mi do recenzji praca doktorska jest doskonałym przykładem szeroko zakrojonych badań mających na celu określenie, dzięki zastosowaniu komplementarnych technik badawczych, sposobu oddziaływania plazmidowego DNA z szeregiem nowych związków, przez co znakomicie wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

W dalszej części recenzji przedstawię moją opinię dotyczącą zarówno strony redakcyjnej, jak i wartości merytorycznej pracy doktorskiej mgr Dominiki Janiszek.

Ocena układu, języka oraz opracowania redakcyjnego rozprawy

Praca doktorska ma układ klasyczny, rozpoczyna się bowiem wstępem literaturowym, opisującym budowę i formy kwasu dezoksyrybonukleinowego, ze szczególnym uwzględnieniem superhelikalności DNA i plazmidów. W dalszej kolejności następuje przedstawienie podstaw elektrochemii kwasów nukleinowych, a następnie znajdujemy obszerny fragment pracy dotyczący oddziaływań DNA z ligandami. W szczególności uwzględniono w przeglądzie związki mogące działać jak leki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Po krótkim rozdziale dotyczącym kondensacji DNA, ostatni fragment części literaturowej opisuje podstawy technik analitycznych stosowanych w pracy.

W dalszej kolejności następuje część eksperymentalna, rozpoczynająca się przedstawieniem celu pracy oraz opis aparatury, odczynników oraz stosowanych procedur. Rozdziały 13 - 25 stanowią zasadniczą część pracy, opisując poszczególne projekty badawcze realizowane przez Doktorantkę. Pracę zamyka: podsumowanie wyników i wnioski oraz bardzo obszerny (zawierający 308 pozycji) spis cytowanej literatury.

Informacje zawarte w części literaturowej pracy w bardzo dobry sposób wprowadzają czytelnika w tematykę prowadzonych badań. Doktorantka przedstawiła jedynie zagadnienia istotne dla rozprawy, co pozwoliło zachować prawidłowe proporcje całej pracy. Praca napisana jest poprawnym językiem a liczba literówek, skrótów myślowych oraz błędów językowych jest bardzo niewielka.

Ocena merytoryczna rozprawy

Pierwszym projektem opisanym w recenzowanej rozprawie było przygotowanie warstw plazmidowego DNA na elektrodach z węgla szklistego poprzez powolną adsorpcję z rozcieńczonych roztworów. Stosowano zarówno plazmidy liniowe, jak i superhelikalne. Przygotowane warstwy receptorowe scharakteryzowano szczegółowo zarówno z wykorzystaniem technik elektrochemicznych, jak i poprzez obrazowanie AFM. Zbadano także wpływ alkoholu etylowego na warstwy DNA, co ma znaczenie z uwagi na rozpuszczalność badanych w dalszych etapach związków. Rozdział ten jest o tyle ważny, że warstwy receptorowe DNA, których przygotowywanie opracowano, były stosowane w dalszych projektach realizowanych przez Doktorantkę.

Kolejnym, zdecydowanie najobszerniejszym projektem zrealizowanym przez Doktorantkę, były badania oddziaływań DNA ze związkami o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. W doświadczeniach wykorzystano IPBD i jego trzy pochodne, które Doktorantka uzyskała dzięki współpracy z Instytutem Przemysłu Organicznego. W pierwszej kolejności przeprowadzono szczegółowe badania elektrochemiczne, dzięki którym stwierdzono, że wszystkie badane związki są elektroaktywne i wszystkie ulegają akumulacji na elektrodzie z węgla szklistego. Eksperymenty wykazały także oddziaływanie związków z plazmidowym DNA, zaobserwowano przy tym wyraźne różnice między stosowanymi pochodnymi, jak również między liniowym a superhelikalnym DNA. W dalszych badaniach wykorzystano techniki spektroskopowe: spektrofotometrię UV-Vis i pomiar dichroizmu kołowego do uzyskania dodatkowych danych dotyczących oddziaływań

między plazmidowym DNA a testowanymi związkami. Obliczono stałe trwałości powstających kompleksów i podjęto próbę ich korelacji z wynikami pomiaru dichroizmu kołowego.

Doktorantka podjęła współpracę z Wydziałem Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w celu zbadania cytotoksyczności IPBD i jego pochodnych. Przeprowadzono testy MTT i LDH dla komórek nowotworu płuc A549. Stwierdzono, że wszystkie badane związki wykazują cytotoksyczność, jednak nie znaleziono bezpośredniej zależności między stałymi trwałości ich kompleksów z plazmidowym DNA wyznaczonymi spektrofotometrycznie a działaniem na komórki nowotworowe. Znaleziono natomiast pewne korelacje toksyczności związków z wynikami badań elektrochemicznych.

Aby rzucić więcej światła na oddziaływanie leków z plazmidowym DNA, Doktorantka przeprowadziła badania analogiczne do tych wykonanych już dla pochodnych IPBD, tym razem dla pentamidyny - związku, dla którego istnieją dane literaturowe na temat oddziaływań z DNA. Stwierdzono, że akumulacja tego leku na elektrodzie GC zależy w pewnym stopniu od helikalności plazmidu. Zaobserwowano także sygnał elektrochemiczny pochodzący od 8-oksyguaniny, co może świadczyć o rozkładzie DNA pod wpływem pentamidyny. Dzięki pomiarom spektroskopowym stwierdzono także powstawanie formy Z-DNA. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, Doktorantka stwierdziła podobieństwa w sposobie oddziaływania pentamidyny i pochodnych IPBD z plazmidowym DNA. Dlatego też przeprowadzono ponownie serię badań elektrochemicznych, spektroskopowych i biologicznych, tym razem analizując łączne działanie obydwu związków na plazmidowe DNA. Zaobserwowano istotne zmiany struktury DNA pod łącznym wpływem obydwu związków. Doktorantka postuluje zbieżność tych danych z przeprowadzonymi badaniami biologicznymi na liniach komórkowych.

Kolejny projekt dotyczył elektrochemicznych badań oddziaływania dwu związków przeciwbakteryjnych z grupy tiazynonów z plazmidowym DNA. Obydwie pochodne charakteryzowały się dość podobnymi własnościami elektrochemicznymi oraz zbliżonym sposobem oddziaływania z liniowym i superhelikalnym DNA. Badania poszerzono o dwa związki z tej samej grupy, charakteryzujące się właściwościami przeciwgrzybiczymi. Zaobserwowano dobrze wykształcone piki utlenienia na elektrodzie GC, w przeciwieństwie do związków przeciwbakteryjnych. Badane substancje wykazywały nieznacznie silniejsze oddziaływanie z superhelikalną formą DNA, w porównaniu do formy liniowej.

W dalszych badaniach skupiono się na oddziaływaniach między plazmidowym DNA a przeciwutleniaczami: rutyną i kwasem askorbinowym. W przeciwieństwie do innych badanych dotychczas substancji, związki te nie wykazywały tendencji do akumulacji na elektrodzie GC, a jedynie rutyna akumulowała na elektrodzie modyfikowanej DNA. Kwas askorbinowy wykazywał taką tendencję w bardzo niewielkim stopniu tylko przy wysokich stężeniach.

Ostatnią częścią prac opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej były badania dotyczące ekstraktów z rośliny *Uncaria tomentosa*. Pnącze to, o polskiej nazwie czepota puszysta, a chyba najszerzej znane w naszym kraju pod nazwą wilcacora, ma często przypisywane "cudowne" właściwości lecznicze, choć praktycznie nie udowodnione w badaniach klinicznych. Co ciekawe, przeprowadzone przez Doktorantkę badania elektrochemiczne i spektroskopowe potwierdziły oddziaływanie składnika lub składników ekstraktu z plazmidowym DNA. Na podstawie wyników pomiaru dichroizmu kołowego wykazano, że składniki ekstraktu powodują przejście formy B-DNA w Z-DNA.

Podsumowując, należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska ma bardzo duży aspekt nowości naukowej. Doktorantka przeprowadziła usystematyzowane i szczegółowe badania oddziaływań z DNA związków mogących w przyszłości być lekami. Analizy zostały przeprowadzone wieloma uzupełniającymi się technikami, co pozwala na wyciąganie wniosków niemożliwych do osiągnięcia tylko przy zastosowaniu np. woltamperometrii.

Jakość wykonanych przez mgr Dominikę Janiszek badań oraz sposób ich opisu oceniam bardzo wysoko. Jednakże, na recenzencie ciąży także obowiązek wytknięcia Autorce niedociągnięć pracy. Dlatego też poniżej wymieniam swoje uwagi do niniejszej rozprawy prosząc, aby Doktorantka w czasie obrony ustosunkowała się do następujących kwestii:

- str. 90: Opis przygotowania wodnego ekstraktu *Uncaria tomentosa* jest dalece niewystarczający. Brak jest informacji o części rośliny, masie materiału roślinnego i ilości wody, czasie i temperaturze prowadzenia ekstrakcji. Opis sposobu prowadzenia doświadczeń powinien umożliwić ich powtórzenie, tu jest to niemożliwe.
- str. 100: na Rys. 48 i na innych rysunkach pokazujących wyniki badań elektrochemicznych umieszczono odchylenia standardowe, brak jest jednak informacji o liczbie elektrod, dla jakich prowadzono pomiary. Nie znalazłem także danych o liczbie powtórzeń w przypadku badań biologicznych.
- str. 114: zbadano wpływ alkoholu etylowego na akumulację plazmidowego DNA na elektrodzie, natomiast dla również stosowanego w pracy jako rozpuszczalnik DMSO przeprowadzono tylko rozważania na podstawie literatury. Niewątpliwie istnieją także dane literaturowe dotyczące wpływu alkoholu etylowego na DNA, czemu więc w tym przypadku zdecydowano się na eksperymenty?
- str. 167: pojawienie się pasma absorpcji przy ok. 280 nm, postulowane dla widm DNA widocznych na Rys. 88, jest bardzo słabo widoczne, zresztą już widmo samego DNA (bez dodatku badanych związków) jest nieznacznie asymetryczne. Prosiłbym o komentarz, czy pełniejsza analiza tych widm byłaby możliwa np. z zastosowanie spektrofotometrii pochodnej.
- str. 167: Założenie stechiometrii 1:1 dla kompleksów badanych związków z plazmidem o długości 2686 bp jest chyba ryzykowne. Czy istnieją jakieś dane uprawdopodobniające takie założenie?
- str. 175: "...można stwierdzić, że IPBD jest aktywny wobec komórek nowotworowych już od niskich stężeń związku (12,5 $\mu\text{g/ml}$)" - na podstawie danych przedstawionych na Rys. 92A, z uwzględnieniem tzw. słupków błędów, można stwierdzić aktywność dopiero od stężenia 50 $\mu\text{g/ml}$.
- str. 177: "Z przeprowadzonych testów MTT i LDH wynika, że wszystkie z przebadanych związków mają właściwości przeciwnowotworowe..." - jest to stwierdzenie nazbyt entuzjastyczne. Doktorantka udowodniła niewątpliwie właściwości cytotoksyczne badanych związków, natomiast aby udowodnić właściwości przeciwnowotworowe, należałoby przeprowadzić badania porównawcze na liniach komórek normalnych i nowotworowych. Dopiero wyraźnie większa toksyczność wobec komórek nowotworowych, w porównaniu do komórek normalnych, dałaby podstawy do wniosku, jaki przedstawiła Doktorantka.
- str. 222: "Jednakże połączenie obydwu substancji zwiększyło cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych poprzez zmniejszenie ich żywotności (MTT) i

zwiększenie śmiertelności (LDH)" - analizując wyniki przedstawione na Rys. 125-128 i biorąc pod uwagę powtarzalność wyników, powyższe stwierdzenie nie znajduje uzasadnienia.

Poniżej wymieniam drobniejsze uwagi do rozprawy, do których Doktorantka nie musi odnosić się podczas obrony:

- str. 40: "Powyżej 0,4 V dochodzi do rozpuszczenia rtęci..." - rtęć się raczej roztwarza.
- str. 61: "Działanie związków przeciwgrzybiczych polega na niszczeniu elementów składowych komórek bakteryjnych..." - to chyba błąd związany z użyciem funkcji copy-paste.
- str. 72: "Główną zaletą SWV jest znaczne zredukowanie prądów pojemnościowych, co wynika z obliczania różnicy pomiędzy prądami I_1 i I_2 ..." - zmniejszenie prądu pojemnościowego wynika głównie z pomiaru prądu przy końcu pulsów potencjału, sumowanie prądów I_1 i I_2 zwiększa sygnał analityczny.
- str. 75: "...ang. Alternative Current Voltammetry, ACV..." - powinno być Alternating Current Voltammetry.
- str. 78: Przy opisie spektroskopii UV-Vis: "... ponieważ każda substancja absorbuje promieniowanie o określonej częstotliwości" - istnieje wiele substancji, które nie absorbują promieniowania w zakresie UV-Vis.
- str. 87: "Wodorotlenek potasu, CZDA, NaOH..." - śmiem się nie zgodzić.
- str. 90: treść tabeli zawierającej parametry stosowanych technik elektroanalitycznych nie jest przetłumaczona na język polski.
- str. 98: "...związek w mikro lub submikro ilościach" - określenie to jest bardzo niezręczne i nie do końca jasne.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Dominikę Janiszek w ramach recenzowanej rozprawy zostały opublikowane dotychczas w jednym artykule z listy JCR, przy czym należy zwrócić uwagę na wysoką rangę czasopisma (*Electrochimica Acta*). Kolejne dwie publikacje są zgodnie z deklaracją Doktorantki w przygotowaniu. Dodatkowo w dorobku mgr Dominiki Janiszek znajdujemy jedną publikację w języku polskim, kolejną w materiałach pokonferencyjnych, dziesięć prezentacji posterowych oraz trzy komunikaty ustne. Sumarycznie należy ocenić dorobek Doktorantki jako dość skromny, natomiast niewątpliwie dużym plusem jest kierowanie przez nią grantem NCN Preludium oraz trzema grantami wewnętrznymi WCh UW. Na uwagę zasługuje także prowadzenie przez Doktorantkę współpracy z Instytutem Przemysłu Organicznego, Wydziałem Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Wydziałem Biologii UW.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Dominiki Janiszek spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku (wraz z późniejszymi poprawkami) podanymi w Ustawie "*Prawo o szkolnictwie wyższym*" i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktorantki do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Z poważaniem,