POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Dr hab. inż. Grzegorz Lota, prof. PP
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Instytut Chemii i Elektrochemii Technicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań, tel. +48 61 665 2158
e-mail: grzegorz.lota@put.poznan.pl

Poznań, 10.02.2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Dominiki Janiszek

„Elektrochemiczne badania oddziaływań plazmidowego DNA z substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwgrzybicznych, przeciwbakteryjnych i przeciwutleniających"

wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
pod kierunkiem
prof. dr. hab. Pawła Kuleszy oraz
dr Hanny Majewskiej - Elżanowskiej

Wstęp

Z punktu widzenia farmakologii, kluczowym elementem pozwalającym na poznanie mechanizmu działania leków przeciwnowotworowych jest ocena charakteru ich oddziaływań z DNA. Poszukiwanie takich substancji wiąże się zazwyczaj z ogromną ilością kosztownych badań. Nic więc dziwnego, że opracowanie nowych metod badawczych, które w ekonomiczny sposób zweryfikują właściwości substancji biologicznie aktywnych, znajduje się w centrum zainteresowania szeregu ośrodków naukowo-badawczych.

Przedłożona do recenzji praca doktorska mająca na celu zweryfikowanie przydatności zaproponowanych, komplementarnych technik badawczych do określenia sposobu oddziaływania plazmidowego DNA z szeregiem nowych związków, doskonale wpisuje się w aktualne trendy badawcze.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa została przedłożona w tradycyjnej formie monografii i obejmuje 300 stron, 162 rysunki i zdjęcia, 2 tabele oraz 308 pozycji literaturowych. Pierwszą część dysertacji Pani mgr Dominika Janiszek stanowi wprowadzenie literaturowe, w którym Doktorantka zawarła wnikliwy opis budowy oraz funkcjonowania wszystkich form kwasu dezoksyrybonukleinowego.

Następnie Doktorantka wprowadziła informacje dotyczące specyfiki badań elektrochemicznych DNA, koncentrując się przede wszystkim na tych, które związane są z wykorzystaniem elektrody rtęciowej.

W dalszej części znajduje się opis oddziaływania DNA z ligandami, a w szczególności z pentamidyną, a także ze związkami przeciwnowotworowymi, przeciwbakteryjnymi, przeciwgrzybiczymi oraz przeciwutleniaczami. Na zakończenie części literaturowej, Doktorantka przedstawiła detekcję oddziaływań DNA z ligandami oraz kondensację DNA, ze szczególnym naciskiem na metody pomiarowe zastosowane w omawianej pracy doktorskiej.

Część eksperymentalna dysertacji poprzedzona została wyraźnie sformułowanym celem pracy wraz z określeniem warunków pomiarowych. Doktorantka opisała aparaturę wykorzystaną w czasie realizacji pracy doktorskiej. Ponadto przestawiła również specyficzne i nowatorskie związki zsyntezowane przez należący do Sieci Badawczej Łukasiewicza – Instytut Przemysłu Organicznego. Należą do nich związki: przeciwnowotworowe IPBD oraz jego trzy pochodne, przeciwgrzybicze DBT i DIT, a także przeciwbakteryjne TDTT i DMPT. Następnie Doktorantka zamieściła metodologię przygotowania powierzchni elektrody badanej z węgla szklistego. W kolejnym rozdziale Pani Janiszek przedstawiła procedurę nanoszenia plazmidowego DNA w wyniku powolnej adsorpcji z silnie rozcieńczonych roztworów (pg/ml), a następnie wyniki badań elektrochemicznych i mikroskopowych zmodyfikowanych elektrod.

W kolejnym rozdziale Autorka zamieściła wyniki badań elektrochemicznych czterech potencjalnych związków przeciwnowotworowych z grupy IPBD. Udowodniła, że IPBD oraz trzy pochodne są elektroaktywne, a zmiana jednego z podstawników wpływa na potencjał reakcji redoks oraz ich kondensację w warstwie DNA. Badania za pomocą spektroskopii UV-VIS również potwierdziły powstawanie kompleksów pomiędzy DNA a IPBD i jego pochodnymi. Z kolei badania cytotoksyczności przeprowadzone na Wydziale Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dla IPBD i jego pochodnych na nowotworowych liniach komórkowych wykazały, że wszystkie związki wykazują właściwości przeciwnowotworowe. Jednakże znalezienie bezpośredniej zależności między stałymi trwałości ich kompleksów z plazmidowym DNA okazało się być zadaniem trudnym. Kolejny rozdział dysertacji doktorskiej dotyczy pentamidyny. Doktorantka wybrała ten związek, ponieważ znany jest sposób jego oddziaływania z DNA. Badania jakie przeprowadziła Autorka były analogiczne do tych wykonywanych dla IPBD i pochodnych. Przeprowadzone badania elektrochemiczne potwierdziły akumulowanie pentamidyny w warstwie plazmidowego DNA. Ponadto zaobserwowano zmiany struktury DNA, o czym świadczy pojawienie się dodatkowego piku, poza obszarem utleniania zasad nukleinowych w plazmidach, charakterystycznego dla utleniania 8 – oksyguaniny. W przypadku dużych stężeń pentamidyny, na widmie UV-Vis pojawia się dodatkowy sygnał, który związany jest z tworzeniem formy Z-DNA, co potwierdziły pomiary dichroizmu kołowego. Na podstawie badań spektroskopowych Doktoranta wykazała, że IPBD i jego pochodne oddziałują w podobny sposób z DNA jak pentamidyna. W następnym etapie przeprowadzono serię badań, gdzie wykorzystano współdziałanie chlorowej pochodnej IPBD i pentamidyny na plazmidowe DNA. Akumulacja pentamidyny w warstwie plazmidu z umiejscowionym Cl-IPBD powoduje zmiany struktury heliksu DNA, przy potencjałach niezależnych od procesów redoks Cl-IPBD. Sugeruje to wzmocnienie efektu przeciwnowotworowego związku Cl-IPBD w obecności pentamidyny. Efekt ten potwierdzają badania

biologiczne na liniach komórkowych. Dodatkowo jednoczesne działanie Cl-IPBD i pentamidyny na plazmidowe DNA ułatwia jego transformację w Z-DNA.

W kolejnej części pracy Pani mgr Dominika Janiszek badała oddziaływanie dwóch związków przeciwbakteryjnych z grupy tiazynonów z plazmidowym DNA. Obydwie pochodne charakteryzowały się zbliżonymi własnościami elektrochemicznymi. W dalszej części badań Doktorantka wykorzystała kolejne dwa związki z grupy tiazynonów, ale o właściwościach przeciwgrzybiczych. W odróżnieniu od związków przeciwbakteryjnych, związki przeciwgrzybicze charakteryzowały się dobrze wykształconymi pikami utleniania w badaniach woltamperometrycznych, co świadczy o szybszych procesach redoks zachodzących w tych związkach.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przebadała oddziaływanie dwóch przeciwutleniaczy (rutyny i kwasu askorbinowego) z plazmidowym DNA. Zarówno rutyna, jak i witamina C ulegają utlenieniu na elektrodzie z węgla szklistego, jak i w warstwach plazmidów. W odróżnieniu od związków przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych i przeciwnowotworowych, przeciwutleniacze nie wykazywały tendencji do akumulacji na elektrodzie, a jedynie rutyna akumulowała się na elektrodzie modyfikowanej DNA.

Ostatnim rozdziałem dysertacji doktorskiej były badania właściwości ekstraktu z winorośli *Uncaria tomentosa* powszechnie znanej pod nazwą „koci pazur". Badania przeprowadzone przez Doktorantkę potwierdziły oddziaływanie składników ekstraktu z plazmidowym DNA. Na podstawie wyników pomiaru dichroizmu kołowego wykazano, że składniki ekstraktu *Uncaria tomentosa* powodują inwersję sygnału, co świadczy o zmianie struktury DNA z prawoskrętnej na lewoskrętną, a zatem prawdopodobnie transformację formy B-DNA w Z-DNA.

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska posiada dużo elementów nowości naukowej. Pani mgr Dominika Janiszek przeprowadziła badania oddziaływań potencjalnych leków z DNA. Badania zostały przeprowadzone metodami elektrochemicznymi i spektroskopowymi, co umożliwiło Doktorantce bardziej wnikliwą analizę i wyciągnięcie wniosków.

Uwagi do pracy

Rozprawa doktorska została napisana poprawnie stylistycznym językiem. Wnikliwa lektura nasunęła Recenzentowi pewne uwagi i sugestie, które przedstawiono poniżej.

- Str. 40: "Powyżej 0,4 V dochodzi do rozpuszczenia rtęci [57], co uniemożliwia badanie utleniania zasad azotowych w DNA" – bardziej poprawnym jest termin „roztwarzanie rtęci".
- Str. 75: „(ang. Alternative Current Voltammetry, ACV)" – raczej Alternating Current Voltammetry.
- Str. 86 i dalsze: Doktorantka opisuje, że w badaniach elektrochemicznych trójelektrodowych jedną z elektrod jest elektroda pracująca. Jest to kalka językowa. Zdaniem Recenzenta zdecydowanie poprawniej brzmi wyrażenie: "elektroda badana".
- Str. 87: "Wodorotlenek potasu, CZDA, NaOH, POCh, Gliwice" – raczej „KOH".
- Str. 87: Autorka podaje, że syntezę związków przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych i przeciwbakteryjnych wykonano w Instytucie Chemii Przemysłowej. Z danych literaturowych wynika, że dr Karpińska jest adiunktem w Instytucie Przemysłu Organicznego należącym do Sieci Badawczej Łukasiewicza.
- Str. 90: „Tabela 1 Parametry elektrochemicznych technik pomiarowych stosowanych w badaniach" została podana w języku angielskim i jest to raczej tabela nr 2 w dysertacji.
- Str. 116-117: „Charakterystyczna budowa potencjalnych związków przeciwnowotworowych, pochodnych IPBD, może sugerować sposób ich oddziaływania z DNA. Skondensowane pierścienie mogą ewentualnie interkalować pomiędzy pary zasad nukleinowych, a grupa fenylowa oddziaływać z zewnętrznym szkieletem kwasu dezoksyrybonukleinowego, na przykład w małym, bądź dużym rowku. Jednak biorąc pod uwagę tylko budowę związków, trudno jest określić

sposób oddziaływań z cząsteczką DNA, a jeszcze trudniej przewidzieć działanie związków jako leków." – czy tego typu oddziaływania można przewidywać za pomocą modelowania molekularnego? Brakuje bardziej konkretnego uzasadnienia wyboru analizowanych związków uwzględniającego spodziewane oddziaływania. W tym miejscu prosiłbym Doktorantkę o komentarz.

- Str. 173: Prosiłbym o uzasadnienie wyboru konkretnej linii komórkowej – nowotworu płuc. Nie jestem specjalistą z zakresu nauk biologicznych, dlatego zainteresowały mnie kryteria wyboru. Czy jest to typowa linia komórkowa czy dość specyficzna? Czy zaproponowane związki są w jakiś sposób zaprojektowane pod ten konkretny nowotwór czy mają charakter ogólny? Proszę o rozwinięcie tej kwestii.
- Str. 173: Czy opisywana aktywność przeciwnowotworowa jest faktycznie aktywnością przeciwnowotworową, czy tak naprawdę aktywnością wobec każdej linii komórkowej. Być może warto przebadać dla porównania zdrową linię komórkową?
- Str. 173: Jaki związek zastosowano jako związek odniesienia podczas badań cytotoksyczności? Rys. 92. Kontrola to komórki bez dodatku analizowanych związków, natomiast nie ma związku odniesienia, w związku z czym trudno w omówieniu wyników odnosić się do aktywności cisplatyny wobec innych komórek - „...Porównując ten wynik z danymi dla cisplatyny oddziałującej z komórkami HepG2 (IC50 wynosi 3,4 μg/ml) [286]" HepG2 to komórki raka wątroby, co czyni tego rodzaju porównania odrobinę spekulacyjnymi.
- Str. 198: Jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę do podjęcia badań aktywności przeciwnowotworowej pentamidyny na dwóch wybranych liniach komórkowych? Tak naprawdę wyniki badań przedstawione na Rys. 110 są bardzo zbliżone, dlatego pojawia się pytanie o celowość wyboru dwóch linii, skoro badania opisane na str. 173 wykonywano na jednej linii.
- Str. 199: „Z badania wynika, że śmiertelność komórek nowotworowych wzrasta wraz ze zwiększającym się stężeniem leku." – to jest raczej

oczywiste w przypadku związków aktywnych, a do takich należy pentamidyna. Celowym wydaje się dyskusja w odniesieniu do dostępnej literatury, która wzbogaciłaby pracę.

- Str. 220: „Z powyższego testu wynika, że Cl-IPBD i pentamidyna działają najefektywniej, gdy są ze sobą pomieszane. Mieszanina obydwu związków znacząco zwiększyła śmiertelność obu linii komórkowych na poziomie około 80%." – warto zauważyć, że praktycznie zawsze opisuje się działanie przeciwnowotworowe pentamidyny w połączeniu z innymi substancjami aktywnymi.
- Związki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze – celowym wydaje się przeprowadzenie analogicznych badań pokazujących ich aktywność względem wybranych bakterii i grzybów, wraz z wyznaczeniem EC50 - analogu IC50. Brak tych badań jest niekonsekwencją w stosunku do badań przeciwnowotworowych.

Ocena i wniosek końcowy

Powyższe uwagi mają charakter dyskusyjny. Należy podkreślić praktyczne znaczenie uzyskanych wyników. Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową, pracę oceniam pozytywnie. Ponadto, część otrzymanych wyników została opublikowana w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania (Electrochimica Acta), a 2 kolejne prace są w przygotowaniu. Na szczególne uznanie zasługuje kierowanie przez Panią mgr Dominikę Janiszek projektem PRELUDIUM finansowanym ze środków Narodowego Centrum Nauki. Należy zaznaczyć, że Doktorantka brała czynny udział w konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. W dorobku ma 3 wystąpienia ustne i 10 prezentacji plakatowych. Dodatkowo w ramach prowadzenia badań związanych z przygotowywaniem dysertacji Doktorantka współpracowała z Wydziałem Farmaceutycznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Wydziałem Biologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Siecią Badawczą Łukasiewicz - Instytutem Przemysłu Organicznego. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Pani mgr Dominika Janiszek jest

przygotowana do dalszej pracy naukowej a recenzowana rozprawa w pełni spełnia kryteria ustawowe i powinna być procedowana w dalszych etapach postępowania przewodu doktorskiego i uzyskania stopnia naukowego doktora (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ze zmianami). Zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego z wnioskiem o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr Dominiki Janiszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową ocenianej pracy i całkowity dorobek Doktorantki, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.