

Jacek Waluk

IChF PAN

Warszawa, 18.10.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Zdrowowicz:

Pochodne zasad nukleinowych jako substancje uwrażliwiające DNA na promieniowanie elektromagnetyczne

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Zdrowowicz wykonana została pod kierownictwem prof. dr hab. Janusza Raka w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Forma pracy jest w Polsce stosunkowo rzadko stosowana: autorka przedstawiła opatrzoną czterdziestostronicowym opisem projektu doktorskiego serię sześciu publikacji. W czterech z nich Pani Zdrowowicz jest pierwszym autorem. Wszystkie prace ukazały się - w latach 2013-2017 - w bardzo dobrych czasopismach z obszaru chemii fizycznej i organicznej. Ze względu na to, że publikacje są wieloautorskie, doktorantka musiała uzyskać odpowiednie oświadczenia od współautorów, a także ocenić swój wkład w każdą z prac. Został on oszacowany w dwóch przypadkach na 80%, dwa razy na 30% oraz - po jednym przypadku - na 60% i 70%.

Tematyka pracy jest ściśle związana z jednym z najważniejszych obszarów współczesnej medycyny – terapii przeciwnowotworowej. Autorka zbadła potencjalne foto- i radiosensybilizatory, to jest substancje, które w wyniku oddziaływania z promieniowaniem elektromagnetycznym potrafią skutecznie uszkadzać DNA tkanek nowotworowych, w wyniku czego dochodzi do ich zniszczenia. Naturalnie podstawą do projektowania efektywnych uczulaczy jest dokładne zrozumienie mechanizmu ich działania. To właśnie było nadrzędnym celem pracy, w trakcie której doktorantka wykonała trzy podstawowe zadania badawcze. Pierwszym z nich było ustalenie mechanizmu procesu fotouczulania DNA przez zawierające brom pochodne pirymidynowych zasad nukleinowych. Opracowano protokół syntezy dwuniciowych oligonukleotydów wielokrotnie znakowanych 5-bromouracyłem (praca w *J. Phys. Chem. B* 2014) oraz 5-bromo-2'-deoksycytydyną (praca w *Org. Biomol. Chem.* 2016). Obiekty te naświetlano promieniowaniem UV a następnie, przy użyciu

rozmaitych metod analitycznych, zidentyfikowano pierwotne i wtórne procesy fotodegradacji. Ustalono, że główny kanał reakcji to tworzenie jednoniciowych pęknięć, które mogą przekształcać się w pęknięcia dwuniciowe. Inna ścieżka reakcji to sieciowanie wewnątrznicowe. Wyznaczono wydajności kwantowe fotodegradacji, które okazały się wyższe dla pochodnej uracylowej. Uzyskane wyniki sugerują możliwość zastosowań klinicznych z wykorzystaniem obu związków.

Drugim celem rozprawy, opisanym w pracy w *J. Phys. Chem. B* z roku 2015, było określenie mechanizmów degradacji bromonukleozydów w wyniku reakcji z rodnikami 2-hydroksypropylowymi, generowanymi zarówno fotochemicznie, jak i radiolitycznie. Rodniki 2-hydroksypropylowe można traktować jako model wtórnych rodników organicznych, powstających w komórkach poddanych działaniu promieniowania. Badaniom poddano cztery pochodne nukleozydów: 5-bromo-2'-deoksyurydyne, 5-bromo-2'-deoksytydyne, 8-bromo-2'-deoksyguanozynę oraz 8-bromo-2'-deoksyguanozynę. Stosując metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, zidentyfikowano produkty reakcji: debromowany nukleozyd i jego addukt z rodnikiem 2-hydroksypropylowym. Wyznaczono wydajności degradacji, a następnie, na podstawie obliczeń kwantowo-chemicznych, zaproponowano mechanizmy odpowiedzialne za tworzenie produktów. Kluczowe dla debromowania jest przeniesienie elektronu, natomiast addukty powstają na drodze substytucji rodnikowej. Porównanie zachowania bromopuryn i bromopirymidyn pozwoliło stwierdzić, że te ostatnie powinny być bardziej efektywnymi sensybilizatorami uszkodzeń DNA.

Trzeci zrealizowany przez doktorantkę cel to zaproponowanie nowych potencjalnych radiouczulaczy uszkodzeń DNA na podstawie badań tiocyjanianowej i selenocyjanianowej pochodnej uracylu. Wybór tych związków uzasadniały opisane w pracy w *J. Phys. Chem. Lett.* z roku 2013 obliczenia DFT, przewidujące nietrwałość tiocyjanianowej pochodnej uracylu (w przeciwieństwie do pochodnej cyjanowej). Przewidywania te zostały potwierdzone eksperymentami wykorzystującymi spektroskopię elektronową. Dalsze badania, cząsteczki 5-tiocyjaniano-2'-deoksyurydiny, tym razem z użyciem elektronowego rezonansu paramagnetycznego oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (praca w *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 2015) pozwoliły na zidentyfikowanie pośrednich i końcowych

produktów radiolizy oraz zaproponowanie mechanizmów reakcji. I znów pomocne okazały się przy tym obliczenia.

Podobną metodologię zastosowano w badaniach pochodnej selenocyjanianowej (praca w *J. Phys. Chem. B*, 2017). Wykazano, że przyłączenie elektronu do tej cząsteczki skutkuje pęknięciem wiązania Se-CN, a powstałe rodniki selenouracylowe dimeryzują. Wykryto także addukt, będący produktem połączenia rodnika selenouracylowego i zawartego w mieszaninie reakcyjnej rodnika $\cdot\text{OtBu}$.

W tej ostatniej publikacji przedstawiono również dane istotne w kontekście możliwych przyszłych zastosowań. Okazało się, że pochodna selenowa jest półtora raza bardziej efektywnie niszczona przez solwatowane elektrony niż 5-bromouracyl. Poza tym zbadano także cytotoksyczność pochodnej selenowej i siarkowej wobec ludzkich komórek nowotworu piersi w warunkach braku promieniowania. Efekt toksyczny objawił się dopiero po przekroczeniu pewnej granicznej wartości stężenia.

Omówione powyżej prace tworzą zwartą, dobrze umotywowaną serię badań. Bardzo podoba mi się połączenie aspektów czysto poznawczych – ustalanie mechanizmów reakcji – z dyskusją możliwości praktycznego zastosowania wyników. Na podkreślenie zasługuje również ścisły związek stosowanych metod eksperymentalnych i teoretycznych, przy czym te ostatnie pełnią często rolę inspirującą.

Powyższe oceny dotyczą publikacji jako całości. Znacznie trudniejsze, jeśli nie wręcz niemożliwe, jest wyłuskanie z nich – i ocena – udziału i roli doktorantki. Z załączonego do materiałów „oświadczenia własnego” wynika, że Pani mgr Zdrowowicz wykonywała prace syntetyczne i analityczne. Przy każdej z omawianych publikacji deklaruje ona również „udział w tworzeniu i korekcie manuskryptu”, nie precyzując jednak, na czym ten udział polegał. Mam nadzieję, że uzyskam taką informację w trakcie obrony.

Nie jest moją rolą recenzowanie publikacji w bardzo dobrych czasopismach, które pomyślnie przeszły przez sieć recenzji. Ograniczyć się więc muszę do opinii na temat opisu projektu doktorskiego. A jest ona bardzo pozytywna. Autorka świetnie przedstawiła motywację do przeprowadzonych badań, aktualny stan wiedzy, i – co chyba najważniejsze – w bardzo klarowny i zwięzły sposób przedstawiła najważniejsze wyniki. Również strona redakcyjna opisu jest bardzo dobra, nie znalazłem tam żadnych istotnych usterek (może z wyjątkiem braku zaznaczenia części B na rysunku 20).

To bardzo dobre wrażenie wzmacnia jeszcze zapoznanie się z dorobkiem naukowym doktorantki. Jest ona już współautorem piętnastu publikacji i ponad trzydziestu komunikatów konferencyjnych. W latach 2013-2016 kierowała grantem NCN PRELUDIUM oraz czterema grantami na Badania Młodych Naukowców. Była stypendystką programu „Start” Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, dwukrotną laureatką Nagrody Rektora Uniwersytetu Gdańskiego oraz laureatką Young Investigator Award konferencji w Pradze. Otrzymała także dwie nagrody za swoją pracę magisterską. Jest to niewątpliwie dorobek bardzo pokaźny i wyróżniający w tym stadium rozwoju naukowego.

Podsumowując: wyniki pracy doktorskiej, w połączeniu z jej dotychczasowym dorobkiem, jasno pokazują, że Pani mgr Zdrowowicz jest świetnie zapowiadającym się badaczem. Nie mam żadnych wątpliwości, że jej rozprawa doktorska: *Pochodne zasad nukleinowych jako substancje uwrażliwiające DNA na promieniowanie elektromagnetyczne* spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane doktorantom (ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455)). Stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Zdrowowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

