



RECENZJA

pracy doktorskiej pani mgr inż. Pauliny Spisz

pt. „Badania radiacyjne i biologiczne pochodnych uracylu w kontekście wspomagania radioterapii”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Spisz została wykonana w Zespole Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza Raka.

W ramach projektu doktorskiego przedstawiono do oceny 4 publikacje:

D1. Makurat, S., Spisz, P., Kozak, W., Rak, J., Zdrowowicz, M.

5-iodo-4-thio-2'-deoxyuridine as a sensitizer of X-ray induced cancer cell killing. International Journal of Molecular Sciences, **2019**, *20*, 1308. IF 4.556

D2. Spisz, P., Zdrowowicz, M., Makurat, S., Kozak, W., Skotnicki, K., Bobrowski, K., Rak, J. *Why does the type of halogen atom matter for the radiosensitizing properties of 5-halogen substituted 4-thio-2'-deoxyuridines?*

Molecules, **2019**, *24*, 2819 IF 3.267

D3. Spisz, P., Kozak, W., Chomicz-Mańka, L., Makurat, S., Falkiewicz, K., Sikorski, A., Czaja, A., Rak, J., Zdrowowicz M.

Potential DNA radiosensitizer and its radiochemical conversion into N-uracil-5-yloxamic acid.

International Journal of Molecular Science – powyższa praca jest w trakcie procedowania (praca otrzymała recenzje). IF 4.210

D4. Spisz, P., Zdrowowicz, M., Kozak, W., Chomicz-Mańka, L., Falkiewicz, K., Makurat, S., Sikorski, A., Wyrzykowski, D., Rak, J., Arthur-Baidoo, E. Ziegler, P., Costa, M. S. R., Denifl, S. *Uracil-5-yl O-sulfamate—an illusive radiosensitizer. On the pitfalls in modeling the radiosensitizing derivatives of nucleobases.*

Journal of Physical Chemistry B **2020**, *124*, 5600-5613. IF 2.95

Ogólna ocena projektu doktorskiego i dokonań naukowych Doktorantki

Moja ogólna ocena dokonań naukowych pani mgr inż. Pauliny Spisz jest wysoka. Doktorantka jest współautorem 5 publikacji naukowych, w międzynarodowych czasopismach naukowych o bardzo dużym współczynniku oddziaływania (łączna wartość IF wynosi 18.923). Jest ona również współautorką zgłoszenia patentowego (Rak, J., Kozak, W., Romanowska, S., Spisz, P., Zdrowowicz, M., *Radiosensybilizator w postaci 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny do zastosowania w radioterapii.* Zgłoszenie patentowe: Polska, Nr zgłoszenia P.427326 z dnia 02.10.2018) oraz 7 prezentacji konferencyjnych. Pani mgr inż. Spisz była kierownikiem czterech grantów Badania Młodych Naukowców w latach 2016-2020 a od 2015 roku wykonawcą w grantie NCN MAESTRO, pt. *Od modelu molekularnego in silico do odpowiedzi komórkowej in vitro. Modyfikowane nukleozydy jako radio- bądź/i fotosensybilizatory uszkodzeń DNA*; nr grantu: 2014/14/A/ST4/00405. W latach 2013 – 2019 uzyskiwała liczne stypendia i nagrody. Na szczególne wyróżnienie zasługuje I miejsce w kategorii najlepszy poster oraz nagroda publiczności podczas V Konferencji Kół Naukowych Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej (2015) a także nagroda za najlepszą prezentację Sesji Sprawozdawczej Doktorantów Wydziału Chemii

w dziedzinie Chemia. Realizacja zaplanowanych badań wymagała od doktorantki znakomitego przygotowania teoretycznego w zakresie biologii molekularnej, chemii radiacyjnej, spektroskopii optycznej oraz praktycznej umiejętności stosowania zaawansowanych metod analitycznych i fizykochemicznych.

Uwagi szczegółowe i dyskusja

Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna, o dużym aspekcie poznawczym i jest istotna z punktu widzenia potencjalnych zastosowań farmakologicznych modyfikowanych nukleotydów w radioterapii chorób nowotworowych.

Profesor Janusz Rak i jego zespół są liderami światowymi, zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i teoretycznych dotyczących reakcji indukowanych światłem i promieniowaniem jonizującym w układach biologicznie ważnych. O randze tych badań świadczą liczne cytowania i współpraca z wiodącymi ośrodkami zajmującymi się oddziaływaniem promieniowania jonizującego z zasadami nukleinowymi i DNA.

Radioterapia to selektywne uwrażliwienie DNA komórek nowotworowych za pomocą substancji chemicznych (leków) dostarczonych do organizmu pacjenta przed ekspozycją na promieniowanie wysokoenergetyczne. Zasady nukleinowe specyficznie modyfikowane atomem chlorowca (MN) są grupą związków, które mogą znaleźć zastosowanie w tej terapii. MN ze względu na podobieństwo strukturalne do natywnych zasad nukleinowych mogą być efektywnie wprowadzane przez polimerazy do DNA komórek organizmu ludzkiego. DNA zawierający modyfikowane nukleozydy posiada te same cechy, co jego natywny odpowiednik i dopiero promieniowanie jonizujące indukuje degradację tkanki nowotworowej. Praca doktorska mgr inż. Justyny Spisz dotyczy tej ważnej tematyki badawczej. Praca jest napisana poprawnym językiem, w sposób jasny ale zapoznanie się z treścią jest czasochłonne gdyż, w mojej ocenie, rozprawa jest zbyt obszerna. Do części wykresów i analiz można było zrobić odwołania do publikacji D1-D4 i ich obszernych suplementów. Cytowane źródła literaturowe (153 pozycji), ilustrujące omawiane zagadnienia zostały prawidłowo dobrane.

W ramach pracy doktorskiej Autorka postawiła sobie jako główny cel kompleksowe zbadanie właściwości radiosensybilizujących czterech pochodnych uracylu: 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydina (BrSdU), 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydina (ISdU), 5-(*N*-trifluorometylokarboksy)-aminouracyl (CF₃CONHU) oraz *O*-amidosiarczan 5-hydroksyuracylu (SU).

Dobór związków do badań nie jest przypadkowy. BrSdU oraz ISdU są związkami fotocuczulającymi a BrSdU dodatkowo był badany pod kątem właściwości radiocuczulających. Dwa kolejne modyfikowane nukleozydy (MN) zastosowano w projekcie doktorskim w oparciu o wyniki obliczeń kwantowo-chemicznych, które wykazały obiecujące właściwości DEA (dysocjacyjne przyłączenie elektronu).

Aby zrealizować powyższy cel Autorka była zaangażowana w wieloetapowe badania eksperymentalne i obliczenia kwantowe. Prace rozpoczęła od syntezy chemicznej wszystkich MN (opisana na stronach 61-65). Schematy syntezy oraz widma NMR i HRMS przedstawiono w rozdziałach 4.1.1 oraz 4.2.1. Autorka wykonała również testy klonogeniczności (strona 67) i badania cytotoksyczności (testy MTT lub WST-1) (strony 68-69). Inne ważne pomiary to: analiza inkorporacji ISdU oraz BrSdU do genomowego DNA (opisana na stronie 69 inkorporacja i izolacja genomowego DNA oraz trawienie enzymatyczne), analiza fosforylacji histonu H2A.X oraz analiza zmian apoptycznych i nekrotycznych za pomocą cytometrii przepływowej (strona 70). Wykonano również pomiary rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów (dane zdeponowano w krystalograficznej bazie danych w Cambridge Crystallographic Data Centre).

Autorka wykorzystwała liczne techniki badawcze takie jak: radioliza stacjonarna (strona 65), wysokosprawna chromatografia cieczowa (strona 66), chromatografia cieczowa sprzęgnięta ze spektrometrią mas (strona 66), miareczkowanie potencjometryczne (strony 72 i 73), radioliza impulsowa (strona 71) oraz



zbadala dysocjacyjne przyłączenie elektronu w fazie gazowej metodą skrzyżowanych wiązek elektronowo-molekularnych (strona 72). Obliczenia kwantowo-chemiczne dla pochodnych BrSdU i ISdU przeprowadzono przy użyciu funkcjonału B3LYP oraz bazy funkcyjnej DGDZVP++. (strony 73 i 74).

Badania zostały precyzyjnie zaplanowane i profesjonalnie wykonane przy użyciu często zaawansowanych technik pomiarowych, a analiza uzyskanych danych jest wnikliwa. **Na szczególne wyróżnienie zasługuje przedstawienie oryginalnych tez oraz ich wiarygodne uzasadnienie.**

W mojej ocenie najważniejszym zagadnieniem badawczym przedłożonego do recenzji projektu doktorskiego jest analiza dysocjacyjnego przyłączenia elektronu do zmodyfikowanych nukleozydów. Rozdział 1.4 jest poświęcony opisowi aktualnego stanu wiedzy dotyczącego właśnie tego zagadnienia w kontekście radiosensybilizujących właściwości badanych MN. Jest to ciekawie napisany fragment pracy doktorskiej. Na pochwałę zasługuje zastosowanie licznych schematów ułatwiających zrozumienie mechanizmów uszkodzeń DNA znakowanego atomami chlorowca. Pozwalają one uświadomić czytelnikowi jak złożony jest mechanizm uszkodzeń modyfikowanego DNA. Opisano tu możliwe reakcje rodników MN powstałych wewnątrz biomolekuły. Generowane w molekułe DNA rodniki mogą powodować zerwanie pojedynczych (SSB) lub podwójnych nici (DSB), cyklizację puryn, sieciowanie wewnątrznicowe i międzynicowe.

Ciekawym obiektem zastosowanym do śledzenia reakcji rodnikowych były 3',5'-difosforany: 5- i 6-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdUDP, 6BrdUDP), 5- i 6-bromo-2'-deoksycytydyny (BrdCDP, 6BrdCDP) (Rysunek 11). Wykazano, że pierwszym procesem jest dehalogenowanie MN indukowane przez przyłączenie elektronu. Kolejnym etapem jest transfer atomu wodoru od cukru w obrębie MN lub cukru sąsiadującego z modyfikowaną zasadą (w kierunku 5'). Opisano tu również jak duży wpływ na właściwości radiouczulające ma miejsce podstawienia atomem bromu. Dla pochodnej, dla której pierwotny rodnik zlokalizowany jest na atomie C5, mechanizm pęknięć nici DNA jest zapoczątkowany transferem atomu wodoru zachodzącym z pozycji C1' lub C2' 2'-deoksyrzybozy sąsiadującej z 6BrdUDP od strony 5' łańcucha. Co jest interesującym, pierwotny rodnik zlokalizowany na atomie C5 może również reagować z cząsteczką wody tworząc bardzo reaktywny rodnik $\cdot\text{OH}$. Tak powstały rodnik reaguje z resztą cukrową prowadząc do zerwania wiązania O-P. Z rozdziału 1.4 dowiadujemy się, że oprócz głównej przyczyny śmierci komórkowej, indukowanej przez pochłonięcie promieniowania jonizującego czyli kumulacji DSB DNA, występuje także międzynicowe sieciowanie DNA. Degradacja indukowana przyłączeniem elektronu badana była przez grupę profesora Raka i profesora Seville nie tylko dla bromopodstawionych analogów, ale także dla innych MN. Jedną z takich pochodnych była 5-tiocyaniano-2'-deoksyurydyna (SCNdU). Po przyłączeniu elektronu do SCNdU w matrycy niskotemperaturowej, dochodzi do dysocjacji wiązania S-CN a w konsekwencji do generowania rodnika $\text{dU-S}\cdot$ oraz anionu $\text{CN}\cdot$. Wyniki stacjonarnej radiolizy roztworu SCNdU wskazują na degradację indukowaną przyłączeniem elektronu w dwóch niezależnych procesach. Pierwszy proces potwierdza mechanizm eksperymentu niskotemperaturowego z detekcją EPR (utworzenie rodnika $\text{dU-S}\cdot$ i anionu $\text{CN}\cdot$), a drugi z nich prowadzi do utworzenia rodnika $\text{dU}\cdot$. Wyniki obliczeń kwantowo-chemicznych wskazały, że ścieżka pierwsza jest korzystniejsza termodynamicznie.

Wymieniłem selektywnie tylko część zagadnień dotyczących właściwości radiosensybilizujących modyfikowanych nukleotydów obszernie opisanych przez Autorkę w rozdziale 1.4. Wybrałem te zagadnienia w celu zadania kilku pytań dotyczących radiolizy impulsowej wodnych roztworów BrSdU (5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny) i ISdU (5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny) opisanych w publikacji kluczowej dla doktoratu, artykułu D2.

Zanim sformułuję pytania, krótko skomentuję pomiary radiolizy impulsowej. Niestety w rozdziale 4.1.4 pojawiło się kilka błędów edytorskich, które



utrudniły analizę procesu radiolizy. Na stronie 99 czytamy, że wzrost absorbancji rejestrowany dla $\lambda_{det}=300$ nm świadczy o tworzeniu produktu przejściowego redukcji ISdU i mamy tu odwołanie do rysunku 49B. To jest błędna numeracja najprawdopodobniej Autorka miała tu na myśli Rys. 39B. Dodatkowy kłopot z analizą rysunku związany jest z informacją w podpisie, że analizowaną długością światła było 305 nm a nie 300 nm. Na rysunku 40 panele C i D zawierają błędną informację o jednostce czasu, zamiast wymienionych minut powinny być sekundy (zgodnie z opisem w publikacji D2). Również podane w opracowaniu Autorki wartości stężeń MN użytych w pomiarach (500 μ M) radiolizy wydają się być zbyt duże. W opublikowanej pracy znajdujemy informację, że wynoszą one 50 μ M. Przy zastosowanej dawce 20 Gy do analizy wartości stałych szybkości reakcji takie stężenie jest wystarczające by zachować warunek pseudopierwszorzędowości reakcji MN z elektronem hydratowanym.

Wnioski płynące z pracy D2 są bardzo interesujące. Przeprowadzona w przypadku ISdU i BrSdU radioliza impulsowa ich roztworów wodnych wykazała, że oba związki ulegają degradacji indukowanej promieniowaniem jonizującym. Jednak tylko w przypadku jodotio pochodnej zidentyfikowano produkt dysocjacyjnego przyłączenia elektronu, który uważany jest za przyczynę uszkodzeń modyfikowanego DNA. Hipoteza, że znacznie dłuższy czas życia anionorodnika BrSdU⁻ w stosunku do ISdU⁻ sprawia, że pierwszy z wymienionych pierwotnych produktów zmiatania elektronów hydratowanych ulega reakcji (reakcjom) protonowania uniemożliwiając jego dysocjację, wydaje się bardzo logiczna. Sprawia to, że BrSdU nie posiada właściwości sensybilizujących i raczej nie jest potencjalnym radiouczulaczem. Wniosek z pomiarów radiolizy impulsowej znalazł potwierdzenie w przeprowadzonych przez Autorkę testach komórkowych (publikacja D1). Obliczenia kwantowo-chemiczne (publikacja D2) wykazały, że bariera kinetyczna dehalogenowania BrSdU wynosi 26 kJ/mol a dla ISdU zaledwie 12.6 kJ/mol (omyłkowo zamieniono te wartości na stronie 7 rozprawy). Ta różnica znajduje odzwierciedlenie w 200 krotnie dłuższym czasie życia BrSdU⁻ w stosunku do ISdU⁻.

Moje pytania do Autorki są następujące:

1. Czy zostały przeprowadzone pomiary radiolizy impulsowej wodnych roztworów ISdU i BrSdU dla pH poniżej 3? Celem takiego eksperymentu jest zbadanie reakcji atomu wodoru z badanymi MN. Dlaczego taki pomiar powinien być pomocnym w potwierdzeniu różnicy w protonowaniu anionorodników ISdU⁻ i BrSdU⁻?
2. Jaka jest rozpuszczalność badanych MN w wodzie? Jeżeli jest porównywalna z tą opisaną w publikacji [1] to pomiary niskotemperaturowe są w mojej opinii kluczowe w dalszych badaniach nad praktycznym zastosowaniem ISdU [2]. Radioliza matryc zawierających ISdU lub BrSdU z detekcją optyczną i zastosowaniem EPR powinna pozwolić potwierdzić różnice w procesie protonacji anionorodników MN. W jaki sposób? Dodatkowo można spodziewać się informacji czy również elektrony prehydratowane są efektywne w procesie pułapkowania elektronów przez MN. Dlaczego?
3. O skuteczności i bezpieczeństwie radioterapii decydować powinien nie tylko dobrze dobrany radiouczulacz ale również sposób podania odpowiednich dawek promieniowania jonizującego. Czy znane są może przesłanki pozwalające stwierdzić, który sposób napromieniowania jest lepszy: wiązką elektronów czy strumieniem fotonów X?
4. Z pomiarów radiolizy impulsowej i stacjonarnej zarówno w temperaturze pokojowej i w matrycach niskotemperaturowych wiadomo, że na migrację elektronu wzdłuż helisy DNA znacząco wpływa proces protonowania w obrębie sąsiadujących z sobą anionorodnika danej zasady i komplementarnej zasady [3,4]. Czy były przeprowadzone pomiary radiolizy impulsowej dla helisy DNA po inkorporacji ISdU lub BrSdU? Czy możliwa jest konkurencja protonowania anionorodnika MN wbudowanego w DNA z zerwaniem wiązania C-

Br lub C-I (efektywne protonowanie produktu reakcji 14 (w przypadku BrZN) w konkurencji do reakcji 15)?

- [1] Zdrowowicz, M., Chomicz, L., Żyndul, M., Wityk, P., Rak, J., Wiegand, T. J., Hanson, C.G., Adhikary, A., Sevilla, M. D. *5-Thiocyanato-2'-deoxyuridine as a possible radiosensitizer: electron-induced formation of uracil-C5-thiyl radical and its dimerization*. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, **2015**, *17*, 16907-16916.
- [2] Rak, J., Kozak, W., Romanowska, S., Spisz, P., Zdrowowicz, M. *Radiosensybilizator w postaci 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny do zastosowania w radioterapii*. Zgłoszenie patentowe ; Polska, Nr zgłoszenia P.427326 z dnia 02.10.2018
- [3] Steenzen, S. *Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides: Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of Their Radical Cations and e⁻ and OH Adducts*. *Chemical Review* **1989**, *89*, 503-520
- [4] Wang, W., Sevilla, M. *Protonation of Nucleobase Anions in Gamma-Irradiated DNA and Model Systems. Which DNA Base is the Ultimate Sink for the Electron*. *Radiation Research* **1994**, *138*, 9-17

Uwagi do edycji rozprawy

i) Brak konsekwencji w nazewnictwie czasopism – część odnośników użytych w rozdziale 6 (Literatura) jest opisana małymi literami a pozostała dużymi.

ii) Rysunek 1 odwołujący się do artykułu [18] został zmodyfikowany o reakcję nie istniejącą w oryginale ($O_2^- + H_2 \rightarrow \cdot OH$ na marginesie powinna być ona zapisana $O_2^- + H_2 \rightarrow 2\cdot OH$) a rysunek 4 powstał najprawdopodobniej z inicjatywy Autorki. Zręczniejszy byłoby napisać, że został opracowany na podstawie artykułu 18 a nie, że został przeniesiony do rozprawy.

iii) Błąd literowy w jednym z diagramów rysunku 4: Pseudosubarty biosyntezy DNA.

iv) Stosując od ponad czterdziestu lat tert-butanol w pomiarach radiacyjnych zdążyłem się przyzwyczaić do zapisu skrótu nazwy alkoholu: t-BuOH. Oczywiście zapis tert-But też jest do zaakceptowania ale wyłamuje się on z ogólnie przyjętej formy: t-BuOH (tak oznaczono ten najprostszyszy alkohol trzeciorzędowy w publikacji D2). Sądzę, że stosowanie konsekwentnie jednego skrótu jest ważne w kontekście rozróżniania rodników generowanych w reakcji rodników hydroksylowych z omawianym alkoholem. W publikacji D1 (kilkakrotnie w tekście i w suplemencie, rysunek 10) znajdujemy oznaczenie rodnika $\cdot t\text{-BuO}$ lub $t\text{-BuO}\cdot$, a w suplemencie do publikacji D3 (strona S10) rodnik jest nazwany [t-But] \cdot w publikacji D2 $\cdot CH_2(CH_3)_2COH$ (w mojej ocenie prawidłowy zapis).

Podsumowanie

Na wstępie pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Pauliny Spisz stanowiła dla mnie zajmującą lekturę ze względu na zawarty w niej bardzo bogaty materiał doświadczalny i zagadnienia związane z ciekawą grupą pochodnych uracylu. Jedna z przebadanych pochodnych może stać się radiouczulaczem stosowanym w radioterapii. Na szczególne wyróżnienie zasługuje wielowątkowe wyjaśnienie mechanizmu wychwytu elektronu przez 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydynę. Nie ulega wątpliwości, że doktorantka w pełni zrealizowała zamierzony cel badań, uzyskując bardzo ciekawe i cenne wyniki w intensywnie badanej na Świecie dziedzinie.

Oceniając wysoko poziom badań naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej stwierdzam, że przedstawiony przez Doktorantkę projekt doktorski spełnia standardy stawiane pracom doktorskim i dlatego wnoszę



do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr inż. Pauliny Spisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska mgr inż. Pauliny Spisz zarówno swym zakresem, poziomem badań i rangą osiągnięć naukowych wykracza poza poziom typowych prac doktorskich. Zostały również spełnione wszystkie warunki wyróżniania doktoratów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. **W związku z tym wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.**

Łódź, 15 10 2020

Marian Wolszczak

