



Prof. dr hab. Bronisław Marciniak
Zakład Fizyki Chemicznej
ul. Umultowska 89b
60-780 Poznań
marcinia@amu.edu.pl

Poznań, dnia 27 listopada 2017

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Zdrowowicz
pt. "Pochodne zasad nukleinowych jako substancje uwrażliwiające DNA na promieniowanie elektromagnetyczne"

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Zdrowowicz pt. *"Pochodne zasad nukleinowych jako substancje uwrażliwiające DNA na promieniowanie elektromagnetyczne"* została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka. Praca dotyczy aktualnej i o dużym znaczeniu tematyki, a mianowicie opisanie mechanizmów indukowanego fotochemicznie i radiacyjnie uszkodzenia DNA z zastosowaniem pochodnych zasad nukleinowych jako uczulaczy, co może być istotne dla nowoczesnej terapii nowotworowej. Jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych od wielu lat, z wielkim powodzeniem, przez profesora Raka i Jego grupę badawczą.

Praca doktorska prezentuje obszerny materiał eksperymentalny o dużym znaczeniu poznawczym. Została przedstawiona w formie sześciu współautorskich publikacji w renomowanych w skali światowej czasopismach naukowych wraz opisem projektu doktorskiego obejmującym wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej oraz następujące podrozdziały: wstęp, cele pracy, wyniki badań, podsumowanie i literatura. Rozprawa zawiera także kopie publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, oświadczenia współautorów oraz podsumowanie dorobku naukowego mgr Zdrowowicz.

Jak już wspomniałem, pracę doktorską stanowi cykl sześciu wieloautorskich artykułów opublikowanych w latach 2013-2017 w czołowych czasopismach naukowych z chemii fizycznej i bioorganicznej takich jak: J.

DZIEKANAT
30.11.2017
30.11.2017

Phys. Chem. B (3 publikacje), J. Phys. Chem. Letters (1 publikacja), PhysChemChemPhys (1 publikacja) oraz Organic & Biomolecular Chemistry (1 publikacja). W czterech z nich mgr Zdrowowicz jest pierwszym autorem. Jak jednoznacznie wynika z załączonych oświadczeń głównych współautorów publikacji, a także z określenia wkładu współautorskiego Doktorantki, udział Jej we wszystkich tych pracach był znaczący, a w czterech dominujący. Jak sama ocenia, Jej udział w większości publikacji polegał na optymalizacji i syntezie związków do badań, wykonaniu większości zadań eksperymentalnych, interpretacji wyników oraz udział w tworzeniu i korekcie manuskryptów. Profesor Janusz Rak, promotor i współautor wszystkich prac, jednoznacznie stwierdza, iż Jego udział w pracach polegał głównie na uczestnictwie w planowaniu projektów, interpretacji wyników eksperymentalnych oraz przygotowaniu poszczególnych manuskryptów. Biorąc więc pod uwagę ww. oświadczenia w mojej opinii, Doktorantka miała pełne prawo wykorzystać wyniki prac wieloautorskich w swojej rozprawie doktorskiej.

Opis projektu doktorskiego, stanowiący swoiste podsumowanie wyników prezentowanych w sześciu artykułach naukowych, został napisany w sposób jasny i przejrzysty. Zawiera kilkanaście rysunków ilustrujących w przystępny sposób omawiane wyniki i schematy reakcji. Jedyne drobne uwagi krytyczne dotyczą braku spisu stosowanych skrótów, co utrudnia czytelnikowi analizę tekstu. W opisie projektu stosowany jest niezupełnie ścisły terminu „rodniki izopropylowe” dla rodników (OH_{isop}[•]).

Ogólnym celem pracy, jak pisze Doktorantka było „wyjaśnienie mechanizmu fotouwrażliwiania DNA przez bromonukleozydy, z drugiej strony – zaproponowanie nowych pochodnych zasad nukleinowych o potwierdzonym potencjale radiosensybilizującym”. W pracy skoncentrowała się na trzech szczegółowych celach badawczych:

- (1) pierwszy dotyczył zrozumienia mechanizmów fotouczulania DNA przez bromopochodne dwóch pirymidynowych zasad nukleinowych 5-bromo-2'-deoxyurydyny (BrdU) oraz 5-bromo-2'-deoxycytydyny (BrdC),
- (2) drugi - zbadania reakcji bromonukleozydów z rodnikami 2-hydroksy-2-propylowymi (OH_{isop}[•]) stanowiącymi model wtórnych rodników organicznych powstałych w komórce na skutek działania promieniowania jonizującego,
- (3) oraz trzeci - poznania właściwości nowych, potencjalnych radiouczulaczy uszkodzeń DNA, a mianowicie tio i selenocyjaninowej pochodnej uracylu.

Na szczególne podkreślenie zasługuje przedstawienie przekonującej argumentacji uzasadniającej podjęcie tego typu badań, łączącej badania podstawowe z potencjalnym zastosowaniem badanych układów jako

efektywnych promieniuczulaczy w leczeniu nowotworów (w fotodynamicznej terapii jak i radioterapii).

Badania mgr Magdaleny Zdrowowicz zawarte w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele nowych i oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę o przydatności pochodnych zasad nukleinowych jako substancji uwrażliwiających DNA na promieniowanie elektromagnetyczne.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr Magdaleny Zdrowowicz zaliczam:

1. Dobór nowoczesnej i mającej ogromne znaczenie badawcze i medyczne tematyki badań wraz z doбором odpowiednich pochodnych nukleozydów do badań fotochemicznych i radiacyjnych.
2. Udowodnienie i opisanie mechanizmów reakcji odpowiedzialnych za uszkodzenia powstałe w wyniku naświetlania promieniowaniem nadfioletowym DNA znakowanego 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU) oraz 5-bromo-2'-deoksycytydyny (BrdC). Wykazanie, że głównym mechanizmem uszkodzeń zmodyfikowanego DNA jest tworzenie jednosieczowych pęknięć, co jest konsekwencją dalekozasięgowego przeniesienia elektronu pomiędzy wzbudzonymi BrdU (BrdC) a guaniną. Zaobserwowanie istnienia drugiego typu reakcji prowadzącej do uszkodzeń DNA, a mianowicie sieciowania wewnątrzniowego (identyfikacja wewnątrzniowych dimerów pirymidynowych połączonych wiązaniem kowalencyjnym). Wyznaczenie ilościowych parametrów fotoindukowanej degradacji znakowanego DNA, a mianowicie wydajności kwantowej rzędu 8×10^{-3} .
3. Wykazanie, iż właściwości fotouczulające zależą od lokalnej sekwencji sąsiadujących zasad, iż 5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) jest lepszym fotosensybilizatorem uszkodzeń DNA aniżeli 5-bromo-2'-deoksycytydyna (BrdC).
4. Udowodnienie mechanizmu reakcji bromopochodnych wybranych nukleozydów pirymidynowych (5-bromo-2'-deoksyurydyna (BrdU) 5-bromo-2'-deoksycytydyna (BrdC)) i purynowych (5-bromo-2'-deoksyguanozyny (BrdG) i 5-bromo-2'-deoksyadenozyny (BrdA)) z rodnikami 2-hydrokso-2-propylowymi (OHIsop^{\bullet}). W badaniach tych zastosowano zarówno fotochemiczne jak i radiacyjne metody generowania rodników (OHIsop^{\bullet}). Wykazano, że w przypadku reakcji bromopirydyn tworzą się dwa produkty końcowe: debromowany nukleozyd (dU lub dC) oraz addukt nukleozyd-rodnik OHIsop^{\bullet} , natomiast dla bromopuryn głównie addukt. Obserwacje te poparte obliczeniami kwantowo-chemicznymi jednoznacznie wskazały na istnienie dwóch różnych mechanizmów zachodzących reakcji; pierwszy, prowadzący do utworzenia adduktów to substytucja rodnikowa, natomiast drugi polega na przeniesieniu elektronu pomiędzy rodnikiem OHIsop^{\bullet} a

- bromonukleozydem, dysocjacji wiązania C-Br w utworzonym anionorodniku, powstaniu reaktywnego rodnika zlokalizowanego na zasadzie nukleinowej i dalszymi reakcjami oderwania atomu wodoru prowadzącymi do nukleozydu (dU lub dC).
5. Wykazanie, że bromopirydyny są efektywniejszymi sensybilizatorami rodnikowych uszkodzeń DNA niż bromopuryny.
 6. Przeprowadzenie systematycznych i dobrze zaplanowanych studiów nad poszukiwaniem nowych, potencjalnych sensybilizatorów DNA o pożądanych właściwościach radiouczulających, polegających na:
 - zaprojektowaniu ich struktur w oparciu o obliczenia teoretyczne,
 - przeprowadzeniu syntezy wybranych związków,
 - potwierdzeniu eksperymentalnym ich sensybilizującego potencjału (za pomocą spektroskopii fotoelektronowej),
 - badaniach mechanizmu reakcji z zastosowaniem odpowiednich metod bezpośredniej obserwacji produktów pośrednich (EPR) jak i metod analizy produktów końcowych (HPLC, MS).
 7. Udowodnienie mechanizmu reakcji zachodzących podczas radiolizy 5-tiocyjano-2'-deoksyurydyny (SCNdU). Wykazanie dwóch niezależnych reakcji: pierwszej polegającej na rozerwaniu wiązania S-CN z utworzeniem anionu CN^- i rodnika 5-tiourydynowego ((dU-S \cdot)) i w konsekwencji produktu trwałego dU-S-S-dU oraz drugiej polegającej na rozerwaniu wiązania S-C w anionorodniku (SCNdU) $^-$ z utworzeniem rodnika 5-urydylowego (dU \cdot) i anionu rodankowego SCN^- .
 8. Udowodnienie mechanizmu indukowanej promieniowaniem jonizacyjnym degradacji dla selenowej pochodnej, a mianowicie 5-selenocyjanouracylu (SeCNU)). Wykazanie rozerwania wiązania Se-CN jako pierwotnej reakcji z utworzeniem rodnika U-Se \cdot i dalszej reakcji wtórnej polegającej na rekombinacji tych rodników z utworzeniem produktu trwałego U-Se-Se-U.
 9. Wykazanie, iż nowe pochodne zasad nukleinowych, a mianowicie tio- i selenocyjaninowe pochodne uracylu, mogą być wielce obiecującymi radiosensybilizatorami DNA w terapii przeciwnowotworowej.

Ważnym podkreślenia jest umiejętne zastosowanie przez Doktorantkę różnorodnych i właściwie dobranych metod badawczych (stacjonarne naświetlania fotochemiczne, generowanie fotochemiczne lub radiacyjne rodników 2-hydroksypropylowych (OH $isop\cdot$) jako reagentów do badania degradacji wybranych nukleozydów, elektroforeza, metody chromatografii cieczerwowej i spektrometrii mas, spektroskopia molekularna m.in. UV-Vis, EPR, PES oraz obliczenia kwantowo-chemiczne), umożliwiających zrealizowanie założonych celów badawczych.

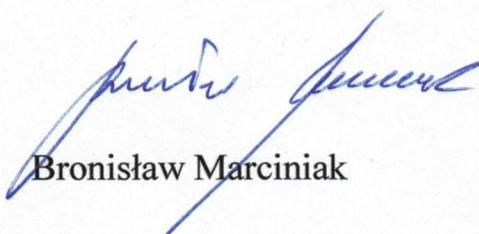
Jednakże sposób wyznaczenia wydajności kwantowej degradacji znakowanego DNA ($\Phi = 8,4 \times 10^{-3}$ i $2,5 \times 10^{-3}$ dla DNA znakowanego BrdU oraz

BrdC) i uwzględnienie efektu filtru wewnętrznego wymaga kilku słów komentarza, o co pozwolę sobie poprosić Doktorantkę w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej. Podobnej dyskusji wymaga problem wydajności przeniesienia energii triplet-triplet pomiędzy wzbudzoną cząsteczką acetonu a stosowanymi bromonukleozydami.

Jak wynika z prezentowanej rozprawy, a także z załączonego całościowego dorobku naukowego, Doktorantka należy do grupy młodych naukowców potrafiących z powodzeniem prowadzić badania z zastosowaniem różnorodnych metod badawczych fotochemii, chemii radiacyjnej i metod chemii analitycznej. Posiada umiejętność interpretacji uzyskanych wyników uwzględniając metody obliczeniowe oraz obszerną literaturę przedmiotu badań. Takie podejście do badań chemicznych charakteryzujące się systematyczną realizacją dobrze zaplanowanych badań zasługuje na bardzo pozytywną ocenę.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Magdaleny Zdrowowicz w pełni odpowiada swoim poziomem naukowym i metodycznym wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie pracy i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na atrakcyjność tematyki badawczej, poziom naukowy, jakość przeprowadzonych badań, wieloaspektowe podejście do badania mechanizmów reakcji oraz jasność prezentacji wyników i ich dyskusji, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej. Jest to jedna z najlepszych prac doktorskich jakie przypadło mi recenzować w mojej karierze naukowej.



Bronisław Marciniak