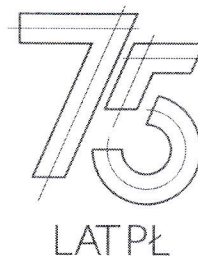


Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej  
Prof. dr hab. inż. Piotr Ulański, z-ca dyrektora Instytutu



Łódź, 12 października 2020 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Pauliny Spisz, doktorantki na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, pod tytułem „*Badania radiacyjne i biologiczne pochodnych uracylu w kontekście wspomagania radioterapii*”; promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Praca doktorska pani mgr inż. Pauliny Spisz dotyczy chemicznych i biologicznych podstaw bardzo obiecującej, nowatorskiej terapii nowotworów. Terapia ta miałaby polegać na wprowadzaniu do DNA komórek nowotworowych specyficznych pochodnych uracylu, które to pochodne pod wpływem promieniowania jonizującego stosowanego w radioterapii miałyby ulegać reakcji dysocjacyjnego wychwytu elektronu, co w efekcie powodowałoby degradację DNA i śmierć komórki.

Sądzę, że przekonywanie kogokolwiek o wadze i aktualności badań mających prowadzić do nowych terapii antynowotworowych jest zbędne. Jest to jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, a zapewne i nauki w ogóle. O ile pewien postęp w tej dziedzinie może się zapewne dokonać poprzez doskonalenie obecnych metod w chemio- i radioterapii oraz medycynie nuklearnej, z pewnością większe nadzieje na przełom w skuteczności leczenia należy wiązać z nowymi, oryginalnymi ideami. Praca pani mgr Spisz zdecydowanie należy do tego ostatniego, pionierskiego nurtu badań.

Na szczególne podkreślenie zasługuje nie tylko pomysł, ale również fakt, że praca p. mgr Spisz jest bardzo obszerna, wielowątkowa i oparta na bardzo szerokiej palecie nowoczesnych metod badawczych, zarówno doświadczalnych (w tym fizykochemicznych i biologicznych), jak i obliczeniowych. W efekcie uzyskano wielostronny obraz badanych zjawisk, niewątpliwie przybliżający nas do ich zrozumienia, i w przyszłości (oby niedalekiej) do ich praktycznego zastosowania. Wyniki uzyskane w tej pracy stały się podstawą czterech publikacji w bardzo dobrych czasopismach naukowych, licznych wystąpięń na konferencjach krajowych i międzynarodowych, a także stypendiów i nagród za działalność naukową.

Warto podkreślić, że Doktorantka jest również współautorką publikacji innych niż te, które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej (artykuł w *Bioorganic Chemistry*, rozdział w monografii wydanej przez wydawnictwo Springer).

Najważniejsze osiągnięcia tej pracy można by streścić następująco:

1. Wykazanie, że określone rodzaje modyfikowanych nukleozydów – pochodnych uracylu – działają jako radiosensybilizatory uszkodzeń DNA.
2. Zbadanie mechanizmu tego efektu polegającego na wychwyceniu uwodnionego elektronu i zapoczątkowaniu w ten sposób sekwencji reakcji mogących prowadzić do uszkodzenia DNA.
3. Stwierdzenie i wyjaśnienie różnic w zachowaniu różnych pochodnych uracylu w badanych reakcjach.
4. Zaobserwowanie i wyjaśnienie istotnych rozbieżności między wynikami obliczeń kwantowo-mechanicznych a danymi doświadczalnymi dla jednej z badanych pochodnych.



5. Wykazanie, że trzy najbardziej obiecujące pochodne uracylu nie wykazują istotnej cytotoksyczności.
6. Wykonanie i zinterpretowanie wyników licznych testów biologicznych pozwalających wskazać mechanizmy biochemiczne powodujące zwiększoną wrażliwość komórek nowotworowych na promieniowanie jonizujące w obecności niektórych pochodnych uracylu.

Praca została zaplanowana i napisana w sposób bardzo dojrzały; obserwowane efekty są poddane wnikliwej analizie i interpretacji. Autorka udowodniła ponad wszelką wątpliwość, że opanowała w swojej dziedzinie obszerny warsztat badacza, posiadała umiejętność formułowania celów badawczych i dobierania do nich odpowiednich technik, analizy i interpretacji złożonych, wielowątkowych zbiorów wyników, ich krytycznej analizy i formułowania wniosków. Opanowała także umiejętność pisania prac naukowych w sposób zarazem precyzyjny i klarowny. Praca jest bardzo dobrze napisana, dojrzałym, sprawnym i poprawnym językiem. Czyta się ją z przyjemnością.

Nie znalazłem w tej pracy żadnych istotnych błędów merytorycznych. Ale, jak w każdej dobrej i obszernej pracy naukowej, tak i tu można znaleźć pewne elementy dyskusyjne, czy też wskazać na pewne niedopowiedzenia czy niejasności.

Moim zdaniem, zagadnieniami, które mogłyby wymagać poszerzenia, uzupełnienia czy wyjaśnienia są przede wszystkim następujące cztery kwestie.

1. W moim odczuciu we wstępnej części pracy zabrakło klarownego wyjaśnienia, jak Autorka wyobraża sobie prowadzenie terapii w oparciu o badane związki. W jaki sposób miałyby one być podawane do organizmu? Jak miałyby wyglądać ich transport? Czy byłyby selektywnie wchłaniane przez komórki nowotworowe (a jeśli tak, to w oparciu o jaki mechanizm)? Czy wbudowywanie tych związków do genomu komórki przebiega selektywnie lub choćby preferencyjnie w komórkach rakowych? Czy mechanizmy te są wspólne dla różnych rodzajów nowotworów? Jaka musiałaby być częstotliwość występowania w DNA tych zmodyfikowanych elementów, by terapia była skuteczna? Jakie efekty uboczne mogą towarzyszyć tej terapii? Czy traktowanie komórek zdrowych (nie nowotworowych) badanymi pochodnymi uracylu również powoduje zwiększenie wrażliwości na działanie promieniowania jonizującego?
2. Kolejnym zagadnieniem, które może budzić pewne wątpliwości, jest to, że postulowany przez Autorkę mechanizm działania pochodnych uracylu jest uzależniony od stężenia tlenu w komórkach. Oczywiście wiemy, że, przynajmniej w guzach litych, występuje zjawisko hipoksji. Powstają tu jednak pewne wątpliwości. Jak niskie musiałoby być stężenie tlenu w komórkach, by opisywana reakcja wygrywała konkurencję ze zmiataniem elektronu przez tlen? W jakiej części komórek litego guza występuje tak niskie stężenie tlenu? Czy śmierć jedynie tych komórek przyniosłaby istotny efekt terapeutyczny?
3. Na podstawie wyliczeń przedstawionych na str. 84 można by łatwo wyliczyć wydajność radiacyjną zaniku substratu. Byłoby interesujące porównanie tej wartości z wydajnością radiacyjną elektronów uwodnionych w badanym układzie. Podobnie, można by wyliczyć wydajności radiacyjne poszczególnych produktów i porównać je z wydajnością zaniku substratu. To pozwoliłoby ustalić bilans materiałowy radiolizy, porównać wydajności poszczególnych kanałów reakcji i stwierdzić, czy obraz radiolizy pokazany na rys. 23 jest zasadniczo kompletny. Analogiczna uwaga odnosi się do wyników radiolizy BrSdU.
4. Wrażenie pewnego niedosytu pozostawiają niektóre fragmenty pracy dotyczące pomiarów wykonanych za pomocą radiolizy impulsowej.
  - a. Ilość pochłoniętej energii promieniowania nie jest tożsama z zabsorbowaną dawką. Grej jest jednostką dawki, nie energii (str. 71). Na tej samej stronie nie podano źródeł zastosowanych do obliczeń dozymetrycznych wartości wydajności radiacyjnej jonorodników rodankowych i ich molowego współczynnika absorpcji. Szkoda, że nie opisano też aparatury pomiarowej użytej w badaniach radiolizy impulsowej, ani zastosowanych procedur prowadzenia pomiarów i analizy wyników.

- b. Na rys. 40 C i D zastosowano nietypową i niezbyt dogodną dla czytelnika skalę czasu, operującą milionowymi i tysięcznymi częściami minut. Bardziej naturalne byłoby przyjęcie jako jednostek sekund (ew. mikro- i milisekund). Jednak porównanie rys. 40 C i D z pierwowzorami z pracy oryginalnej D2 zdaje się wskazywać, że minut jako jednostek użyto omyłkowo.
- c. W jaki sposób sprawdzano, czy kinetyka danego procesu ma charakter pierwszorzędowy, pseudo-pierwszorzędowy czy drugorzędowy? Nie pokazano np. zależności czasów połowkowych od dawki i/lub stężeń substratów.
- d. Nie jest jasne w jaki sposób wyliczono wartości drugorzędowych stałych szybkości reakcji podane na str. 102. Jakie założenia przyjęto w tych obliczeniach?

Żadna praca o tej objętości i stopniu skomplikowania nie jest wolna od pewnych usterek czy drobnych niedopowiedzeń. Obowiązek recenzenta nakazuje mi o nich wspomnieć.

- Na stronie 5 czytamy: „W warunkach hipoksji elektrony hydratowane (również powstające w trakcie radiolizy wody) generowane są równie licznie co rodniki  $\cdot\text{OH}$ .” Czy to się istotnie różni od radiolizy w zwykłych warunkach fizjologicznych? I tam wydajność radiacyjna elektronów uwodnionych jest zbliżona do wydajności radiacyjnej  $\cdot\text{OH}$ , tyle że elektrony te (w braku efektywniejszych zmiataczy) reagują następnie z tlenem.
- Motywacja do podjęcia badań opisanych w tej pracy jest jasna i czytelna; Autorka pisze o tym klarownie i przekonująco na str. 6. Nieco mniej oczywisty jest wybór modyfikowanych nukleozydów – dlaczego pochodne uracylu i dlaczego właśnie te?
- W drugim akapicie na str. 7 prawdopodobnie jest błąd. Czytamy najpierw, że „wysokość bariery aktywacyjnej w procesie DEA (...) wynosi 12,6 i 26 kJ  $\cdot$  mol<sup>-1</sup> (...), odpowiednio dla BrSdU i ISdU.” Ale dalej napisano, że bariera jest „znacząco większa” w przypadku BrSdU. Ta sama usterka pojawia się w angielskim streszczeniu pracy.
- Hipoksja nie jest stanem zupełnego braku tlenu, a jedynie jego obniżonego stężenia. Dlatego trudno zaakceptować stwierdzenie (str. 29), że w warunkach hipoksji „elektrony hydratowane nie reagują z tlenem”. Zapewne reagują, jedynie z mniejszą szybkością niż przy stężeniu tlenu w komórkach zdrowych, przez co reakcja ta staje się nieco mniej konkurencyjna w stosunku do innych reakcji elektronu (np. DEA).
- Wielekroć określenie „rodnik hydroksylowy” jest łączone z przymiotnikiem „genotoksyczny”. Oczywiście, reakcje rodnika  $\cdot\text{OH}$  z DNA prowadzą do uszkodzenia genów. Jednak powtarzające się w tekście pracy określenie „genotoksyczny rodnik hydroksylowy” może skłaniać mniej fachowego czytelnika do przekonania, że owa genotoksyczność jest jakąś szczególną, wyjątkową właściwością rodników  $\cdot\text{OH}$ . Tymczasem rodniki  $\cdot\text{OH}$  są przecież „toksyczne” nie tylko dla DNA; ich selektywność jest bardzo niska i reagują praktycznie ze wszystkimi obecnymi w komórce związkami organicznymi (i z częścią nieorganicznych, w tym nawet z jonami metali na najwyższych typowych stopniach utlenienia). Zatem genotoksyczność nie jest ich jakąś szczególną, wyjątkową cechą.
- Czy procedury syntetyczne i pomiarowe opisane na str. 61-65 oraz 67 zostały opracowane przez Doktorantkę w ramach niniejszej pracy (na co wskazywałby brak odnośników literaturowych)?
- Doświadczenie recenzenta z odtlenianiem roztworów wodnych (wsparte pomiarami przy użyciu elektrody tlenowej) wskazuje, że 3 minuty nasycania argonem może być niewystarczającym czasem do skutecznego usunięcia tlenu. Oczywiście zależy to od objętości próbki, geometrii naczynia i kilku innych czynników.
- Jaka była moc dawki przy napromienianiu próbek promieniami X i jak tę moc dawki wyznaczono?
- Z czego wynikały znaczne różnice składów roztworów poddanych radiolizie stacjonarnej i impulsowej (stężenie substratów, stężenie zmiatacza)?

- Czy utrzymywanie badanych substratów w temperaturze 155 °C (str. 72) nie powoduje ich degradacji ?
- Czy urządzenie badawcze opisane na str. 72 jest aparaturą komercyjnie dostępną, czy też zostało skonstruowane przez Zespół, w którym działała Autorka ?
- W opisie miareczkowania konduktometrycznego stężenie titranta podano raz jako 24 mM, a raz jako 20 mM.
- Czy 4-tio-2'-deoksyurydyna może powstać w wyniku napromienienia ISdU poprzez mechanizm inny niż DEA ?
- Ostatni akapit na str. 92 wymaga komentarza. Skoro wydają reakcję z nadtlaniem wodoru obserwowano w roztworze zawierającym 30 mM tert-butanolu, to ów nadtlenek wodoru pochodzi zapewne z rekombinacji  $\cdot\text{OH}$  (jak napisano), ale z rekombinacji w gniazdach, zanim rodniki  $\cdot\text{OH}$  stają się łatwo dostępne dla reakcji ze zmiataczem. Potwierdzeniem postulowanego mechanizmu utleniania mogłoby zapewne być proste doświadczenie bez użycia promieniowania, polegające na dodaniu do badanego układu nadtlenu wodoru w odpowiednim stężeniu.
- Oczywiście wynik wskazujący na znikomą cytotoksyczność badanych pochodnych względem zdrowych komórek należy uznać za pozytywny i pożądany. Dlaczego jednak również pożądanym wynikiem (jak wydaje się wynikać z podsumowania na str. 170-171) jest fakt, że badane związki nie wykazują cytotoksyczności względem komórek nowotworowych ?
- Drobne usterki językowe zdarzają się zupełnie wyjątkowo („ w pierwszym kroku studiowano nad właściwościami radiosensybilizującymi BrSdU i ISdU”, str. 60). Może nie wszędzie zgodziłbym się z zastosowaną interpunkcją, ale po części jest to kwestia stylu, a poza tym oczywiście nie ma to żadnego wpływu na ogólną ocenę pracy. Oby wszyscy autorzy doktoratów i publikacji potrafili pisać tak logicznie i jasno.
- Sposób sformatowania spisu bibliografii jest nieco niekonsekwentny. Przejawia się to zwłaszcza w niekonsekwentnym stosowaniu wielkich i małych liter w nazwach czasopism, w tym nawet w nazwie tego samego czasopisma (por. przykładowo pozycje 61 i 62), a niekiedy również w tytułach cytowanych artykułów (por. poz. 74, 119, 130, 131).

Chciałabym podkreślić, że wymienione wyżej uwagi krytyczne mają jedynie drugorzędne znaczenie i w żadnej mierze nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska pani mgr inż. Pauliny Spisz jest aktualna, ciekawa i wartościowa, stoi na bardzo wysokim poziomie i zawiera istotne elementy nowości naukowej. Doktorantka wykazała się dogłębną znajomością przedmiotu, umiejętnością stawiania śmiałych hipotez, właściwego planowania badań z wykorzystaniem bardzo bogatego wachlarza odpowiednio dobranych metod doświadczalnych i obliczeniowych, twórczej ale jednocześnie krytycznej interpretacji i oceny wyników oraz biegłością w pisaniu prac naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia formalne wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie pani mgr inż. Pauliny Spisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wymienione powyżej obserwacje, bardzo wysoki poziom pracy, istotne elementy nowości naukowej, a także fakt, że praca jest podstawą czterech bardzo dobrych publikacji w renomowanych czasopismach naukowych, wnoszę do Rady o wyróżnienie tej rozprawy.