

Szczecin, 12.06.2018

Prof. dr hab. inż. Jolanta Tarasiuk
Katedra Biochemii
Wydział Biologii
Uniwersytet Szczeciński

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Gołuńskiego pt. "Metyloksantyny jako modulatory antybiotyków antracyklinowych i aromatycznych mutagenów – analiza oddziaływań z DNA oraz aktywności biologicznej"

Toksyczność stosowanych klinicznie klasycznych leków przeciwnowotworowych jest jednym z najistotniejszych problemów w terapii nowotworów. Warunkiem powodzenia prac zmierzających do opracowania efektywnych modulatorów działania tych chemioterapeutyków, mających na celu obniżenie ich toksyczności, jest poznanie mechanizmów tych oddziaływań na poziomie komórkowym.

Dlatego też uważam, że cel pracy doktorskiej Pana mgr Grzegorza Gołuńskiego, dotyczący określenia mechanizmów molekularnych związanych z wpływem metyloksantyn na aktywność doksorubicyny i idarubicyny, należących do ważnej klinicznie grupy antybiotyków antracyklinowych, jest bardzo istotny nie tylko naukowo, ale również ma potencjalnie bardzo duże znaczenie kliniczne. Zmierza bowiem do opracowania nowych strategii mających na celu poprawę indeksu terapeutycznego tych leków, które mimo swojej wysokiej aktywności przeciwnowotworowej charakteryzują się silną toksycznością. Do badań wyselekcjonowano trzy metyloksantyny, tj. kofeinę i teofilinę należące do naturalnych związków oraz pentoksyfilinę będącą syntetyczną metyloksantyną. Dodatkowo włączono do nich modelowy związek ICR-191 o silnych właściwościach mutagennych, należący do grupy związków akrydynowych. Recenzowana praca doktorska została wykonana w Pracowni Biofizyki Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego (UG) i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) pod kierunkiem dr hab. Jacka Piosika, prof. UG i dr Anny Woziwodzkiej, będącej promotorem pomocniczym przedłożonej rozprawy. Praca ta jest częścią kompleksowych badań prowadzonych przez zespół Promotora rozprawy dotyczących oddziaływań stakingowych pomiędzy metyloksantynami i różnorodnymi grupami związków aromatycznych z wykorzystaniem zaawansowanych modeli statystyczno-matematycznych.

We „Wstępie” rozprawy Autor przedstawił w sposób zwięzły charakterystykę badanych związków, tj. metyloksantyn ze szczególnym uwzględnieniem pentoksyfiliny i jej potencjalnego znaczenia w terapii nowotworów oraz wyselekcjonowanych ligandów aromatycznych (związku modelowego ICR 191 oraz leków przeciwnowotworowych – doksorubicyny i idarubicyny). Zdefiniował też w przejrzysty sposób statystyczno-termodynamiczne modele wykorzystywane w pracy do badania oddziaływań z DNA w zaprojektowanych systemach eksperymentalnych. Ta część rozprawy świadczy o dobrej i szerokiej znajomości zagadnień bezpośrednio związanych z tematyką pracy doktorskiej. Chciałabym przy tym podkreślić znajomość najnowszej literatury, gdyż znacząca część cytowanych przez Doktoranta pozycji pochodzi z okresu ostatnich 10 lat. Wśród nich znajdują się również prace najnowsze z lat 2012-2016. Spis literatury został przygotowany w sposób na ogół staranny, chociaż znajdują się w nim liczne błędy w numeracji począwszy od pozycji 44, co nieco utrudnia śledzenie cytowanych przez Autora publikacji w czasie studiowania „Wstępu” rozprawy doktorskiej.

Cel pracy oraz zadania badawcze zostały sformułowane w rozprawie w sposób jasny i niebudzący żadnych wątpliwości merytorycznych. Dotyczyły one oddziaływań wyselekcjonowanych związków z DNA, odpowiednio w systemach dwuskładnikowych i trójskładnikowych, oraz oceny wpływu tych oddziaływań na ich aktywność biologiczną. Na podkreślenie zasługuje stosowanie w badaniach szeregu biofizycznych, biochemicznych i biologicznych metod eksperymentalnych z wykorzystaniem m.in. spektrofotometrii, pomiarów mikrokalorymetrycznych, konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej i cytometrii przepływowej oraz testów mutagenności i komórkowych testów cytotoksyczności, jak również zaawansowanych modeli statystyczno-termodynamicznych. Studiując wyniki kolejnych publikowanych prac doświadczalnych zamieszczonych w rozprawie daje się zauważyć sukcesywne wzbogacanie i rozszerzanie zakresu stosowanych technik eksperymentalnych, co świadczy o wzbogacaniu warsztatu badawczego przez Doktoranta. Jest to bardzo istotne w dążeniu do prowadzenia przez niego w przyszłości dojrzałej interdyscyplinarnej działalności naukowej.

W końcowej części rozprawy doktorskiej Autor dokonał podsumowania uzyskanych wyników. Syntetyczny sposób ich przedstawienia oraz interpretacji świadczy o szerokiej wiedzy nabytej przez mgr Grzegorza Gołuńskiego z zakresu biofizyki, biochemii, biologii molekularnej i chemioterapii eksperymentalnej oraz stosowania zaawansowanych statystyczno-termodynamicznych modeli oddziaływań. Na podkreślenie zasługuje również duża odpowiedzialność Doktoranta przy formułowaniu wniosków, co świadczy o jego

dojrzałości badawczej. Cennym jest również wskazanie przez Autora rozprawy perspektyw dalszych badań dotyczących potencjału terapeutycznego pentoksyfiliny w leczeniu nowotworów jako modulatora aktywności chemioterapeutyków z grupy antybiotyków antracyklinowych.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie doktorskiej uważam: i. opracowanie zaawansowanego modelu statystyczno-termodynamicznego, bazującego na założeniach modeli „ligand-DNA” i „ligand-metyloksantyna (MTX)” dla związków posiadających potencjał do dimeryzacji; ii. wykazanie, że oddziaływanie badanych metyloksantyn (kofeiny, teofiliny i pentoksyfiliny) z wyselekcjonowanymi ligandami aromatycznymi (związkiem modelowym ICR 191 oraz lekami przeciwnowotworowymi – doksorubicyną i idarubicyną) prowadzi do zmniejszenia oddziaływań tych ligandów z DNA i w dalszej konsekwencji do obniżenia ich aktywności mutagennej; iii. wykazanie, z zastosowaniem keranocytów jako modelu nienowotworowych komórek eukariotycznych, że pentoksyfilina wywiera efekt ochronny na komórki prawidłowe poddane cytotoksycznemu działaniu doksorubicyny; iv. wykazanie z użyciem modelowych linii raka piersi MCF-7 oraz czerniaka MEL-Juso, że pentoksyfilina nie powoduje spadku aktywności przeciwnowotworowej doksorubicyny w stosunku do komórek nowotworowych.

Rozprawa napisana jest zasadniczo poprawnym językiem naukowym. Mam jednak kilka uwag szczegółowych, zarówno o charakterze merytorycznym jak i redakcyjnym: i. trudno zgodzić się z opinią Doktoranta, że „jedynie nieliczne zespoły badawcze podjęły się badań nad idarubicyną (IDA)” (str. 16), zważywszy na fakt, że w bazie PubMed znajduje się ponad 2000 publikacji dotyczących tego leku przeciwnowotworowego; ii. cytowana przez Autora pozycja literaturowa 24 dotyczy białaczek, a nie chłoniaków, jak podano w tekście (str. 12); iii. idarubicyna jest półsyntetyczną, a nie syntetyczną antracykliną, jak stwierdzono w rozprawie (str. 16); iv. str. 12 – określenie „utlenienie komórek nowotworowych” jest nieprawidłowe i powinno być zastąpione zwrotem „dotlenienie lub utlenowanie komórek nowotworowych”; v. str. 15 – warto zastąpić zwrot „formowanie wolnych rodników” bardziej prawidłowym polskim odpowiednikiem tego określenia, tj. „tworzenie wolnych rodników”; vi. str. 16 – wskazanym byłoby zastąpienie określenia „wielolekooporne komórki nowotworowe” stosowanym w polskiej terminologii zwrotem „komórki nowotworowe o oporności wielolekowej”. Te drobne uwagi wymienione powyżej nie rzutują jednak na moją pozytywną ocenę merytoryczną rozprawy doktorskiej.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji ocenianego doktoratu i zamieszczone w recenzowanej rozprawie zostały opublikowane w postaci 4 prac doświadczalnych w

czasopismach z listy filadelfijskiej: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (IF - 2.930), *Chemico-Biological Interactions* (IF - 3.143), *Biochimie* (IF - 3.112) i *Bioorganic Chemistry* (IF - 3.231), w których mgr Grzegorz Gołuński jest pierwszym autorem. Łączna wartość IF tych prac wynosi 12.416 (punkty MNiSW - 105), co daje w przeliczeniu na jedną publikację doświadczalną wartość IF - 3.104 (punkty MNiSW - 26.25). Przytoczone wartości wskazują na bardzo dobry poziom naukowy publikacji będących podstawą pracy doktorskiej. Załączone oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy wskazują na ważną rolę koncepcyjną i udział doświadczalny Doktoranta w powstaniu tych prac. Ponieważ jednak są to artykuły opublikowane z udziałem stosunkowo dużej liczby autorów (2 prace – po 5 autorów; 2 prace – po 7 autorów), którzy współuczestniczyli w przeprowadzeniu części eksperymentów (m.in. pomiarów spektrofotometrycznych, eksperymentów z użyciem testu Amesa i doświadczeń z chromatyną), a co więcej - wykonali część badań bez udziału Doktoranta (m.in. eksperymenty mikrokalorymetryczne, doświadczenia z użyciem testu MTT, analizy cytometryczne cyklu komórkowego oraz doświadczenia z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego), jak również uczestniczyli w projektowaniu tych doświadczeń oraz analizie uzyskanych wyników, dlatego ze względów formalnych wskazany byłoby także określenie udziału procentowego współautorów w poszczególnych publikacjach. Mogłoby to ułatwić recenzentowi podjęcie decyzji dotyczącej ewentualnego złożenia wniosku o wyróżnienie ocenianej pracy doktorskiej.

Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy Pana mgr Grzegorza Gołuńskiego dotyczy w całości obszaru nauk biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem dyscypliny biochemia. Liczy on ogółem 13 publikacji (łącznie IF - 35.002; punkty MNiSW - 310), z czego na dorobek poza rozprawą doktorską składa się 6 najczęściej wieloautorskich oryginalnych prac eksperymentalnych (IF - 22.586, punkty MNiSW - 205) i 3 prace przeglądowe. Dotyczą one, obok głównego nurtu naukowego Doktoranta związanego z badaniem wpływu metyloksantyn na aktywność biologiczną związków aromatycznych z różnorodnych grup chemicznych, określenia mechanizmów molekularnych działania fulerenu 60 na komórki zarówno prokariotyczne, jak i eukariotyczne, jak również oceny potencjału terapeutycznego tego związku w leczeniu nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów opornych na klasyczną chemioterapię. Wprawdzie w większości dodatkowych prac niewchodzących w skład pracy doktorskiej (łącznie w 7 na 9 opublikowanych prac) Doktorant nie należy do autorów

wiodących, jednak dorobek ten świadczy o jego rozległej aktywności badawczej oraz umiejętności pracy w dużych zespołach interdyscyplinarnych. O dużej aktywności naukowej Doktoranta świadczy również jego udział w licznych konferencjach naukowych zarówno krajowych, jak i międzynarodowych. Doktorant jest współautorem łącznie 24 doniesień konferencyjnych (3 referatów i 21 posterów). Jego dorobek naukowy został wyróżniony kilkoma prestiżowymi nagrodami, m.in. 2 nagrodami I stopnia Rektora UG i wyróżnieniem im. W. Mozolowskiego przyznanych przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne. O docenieniu dorobku mgr Grzegorza Gołuńskiego jako młodego naukowca świadczy również przyznanie mu Stypendium Prezydenta Miasta Gdańska oraz stypendiów dla najlepszych doktorantów.

W **podsumowaniu oceny rozprawy doktorskiej** stwierdzam, że jest ona znaczącym osiągnięciem naukowym Doktoranta i jego Promotora zrealizowanym z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych. Oceniana rozprawa świadczy również o dużej wiedzy Doktoranta w zakresie biologii molekularnej nowotworów. Dowodzi także opanowania przez niego bogatego warsztatu metodycznego.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Stwierdzam też, że **dorobek naukowy** Pana mgr Grzegorza Gołuńskiego uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Gołuńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab inż. Jolanta Tarasiuk