



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Biofizyki

dr hab. Olga Wesołowska

Wrocław, 10 maja 2018

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Gołuńskiego zatytułowanej
„Metyloksantyny jako modulatory antybiotyków antracyklinowych
i aromatycznych mutagenów – analiza oddziaływań z DNA oraz
aktywności biologicznej”

Ze względu na wzrastającą na całym świecie zapadalność na choroby nowotworowe i wciąż niezadowalające wyniki terapii, skuteczne zwalczanie tych chorób stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnych nauk medycznych. Nieustanne poszukiwanie nowych substancji o aktywności przeciwnowotworowej, coraz lepsze poznawanie szlaków sygnałowych i metabolicznych komórek nowotworowych, a także techniki, pozwalające na wybiórcze niszczenie ognisk nowotworowych, stanowią podstawy do opracowywania nowoczesnych terapii. Inne podejście stanowią próby zwiększenia skuteczności dotychczas stosowanych leków przeciwnowotworowych poprzez łączne podawanie ich z innymi substancjami, tzw. terapia kombinowana. Obecność substancji dodatkowych ma za zadanie zwiększyć skuteczność chemioterapeutyku, zredukować jego skutki uboczne lub ułatwić dostarczenie leku do tkanki nowotworowej. Badania prowadzone przez mgr. Grzegorza Gołuńskiego wpisują się właśnie w ten drugi nurt badań i dotyczą modulacji oddziaływania antybiotyków antracyklinowych (takich jak doksorubicyna bądź idarubicyna) z DNA przez związki z grupy metyloksantyn. Badania te są - do pewnego stopnia - kontynuacją tematyki,

którą zespół Pracowni Biofizyki Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr. hab. Jacka Piosika, prof. UG, zajmuje się od ok. 10 lat. Należy zwrócić uwagę na niezwykle pragmatyzm stosowanego przez zespół badawczy prof. J. Piosika podejścia. W przypadku powodzenia, koszty takiej terapii kombinowanej byłyby znacząco niższe niż wielu nowoczesnych terapii celowanych związanych z wykorzystaniem np. przeciwciał monoklonalnych.

Formalna ocena rozprawy

W skład przedstawionej mi do oceny rozprawy wchodzi cztery opublikowane prace doświadczalne dotyczące modulacji oddziaływania ligandów aromatycznych z DNA przez metyloksantyny.

1. Gołuński G, Woziwodzka A, Iermak I, Rychłowski M, Piosik J. (2013) Modulation of acridine mutagen ICR191 intercalation to DNA by methylxanthines – analysis with mathematical models. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 3280-3289.
2. Gołuński G, Borowik A, Wyrzykowski D, Woziwodzka A, Piosik J. (2015) Pentoxifylline as a modulator of anticancer drug doxorubicin. Part I: Reduction of doxorubicin DNA binding. *Chem. Biol. Interact.* 242, 291-298.
3. Gołuński G, Borowik A, Derewońko N, Kawiak A, Rychłowski M, Woziwodzka A, Piosik J. (2016) Pentoxifylline as a modulator of anticancer drug doxorubicin. Part II: Reduction of doxorubicin DNA binding and alleviation of its biological effects. *Biochimie* 123, 95-102.
4. Gołuński G, Borowik A, Lipińska A, Romanik M, Derewońko N, Woziwodzka A, Piosik J. (2016) Pentoxifylline affects idarubicin binding to DNA. *Bioorg Chem.* 65, 118-125.

Sumaryczny IF opublikowanych prac wynosi 12,055, a liczba punktów ministerialnych 105. We wszystkich artykułach Doktorant jest pierwszym autorem; jego wkład w powstanie każdej z prac został jasno określony.

Ponadto w skład rozprawy wchodzi krótkie opracowanie teoretyczne, wprowadzające czytelnika w opisywane zagadnienia, prezentujące cel i założenia badań, a także metodologię pracy (w szczególności zastosowane modele matematyczne). Całość zamyka zwięzłe podsumowanie uzyskanych wyników. Rozprawa doktorska zaopatrzona została również w streszczenie w językach polskim i angielskim.

Praca doktorska wykonana została w Pracowni Biofizyki Katedry Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pracy był dr hab. Jacek Piosik, prof. UG, a promotorem pomocniczym dr Anna Woziwodzka.

Merytoryczna ocena rozprawy

Metyloksantyny, takie jak kofeina, czy teofilina, posiadają zdolność do tworzenia niekowalencyjnych kompleksów z lekami przeciwnowotworowymi z grupy antracyklin, a także z innymi związkami aromatycznymi. Tworzenie takich kompleksów może przejściowo obniżyć zdolność ligandów aromatycznych do oddziaływania z DNA, wywierając w ten sposób funkcję ochronną. Proponowane są dwa mechanizmy wyjaśniające to zjawisko. Pierwszy model zakłada, że metyloksantyny – poprzez tworzenie mieszanych agregatów – przechwytyują cząsteczki liganda, obniżając w ten sposób liczbę jego cząsteczek, które mogą związać się z DNA. Według drugiego modelu metyloksantyny miałyby wiązać się bezpośrednio z DNA, w ten sposób zmniejszając liczbę miejsc wiążących dostępnych dla liganda.

W pierwszej z prac wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej Autor badał oddziaływanie pochodnej akrydyny – mutagenu ICR191 – z trzema metyloksantynami. Zastosowanie metod spektrofotometrycznych w połączeniu z obliczeniami opartymi o – wcześniej opracowane – statystyczno-termodynamiczne modele oddziaływań pozwoliło wykazać, że wzrost stężenia kofeiny w układzie mutagen:DNA w roztworze wodnym powoduje spadek ilości zarówno wolnej formy ICR191, jak i formy związanej z DNA. Jednocześnie zauważono zwiększenie ilości mutagenu związanego w kompleksie z metyloksantyną. Podobnych obserwacji dokonano w układzie modelowym zawierającym komórki eukariotyczne, mutagen oraz kofeinę. Zestawienie danych eksperymentalnych z wynikami otrzymanymi z modelowania przywiodło Autora do wniosku, że główną rolą metyloksantyn w badanym układzie było przechwytywanie cząsteczek ICR191 poprzez tworzenie z nimi kompleksów, co skutkowało zmniejszeniem wiązania mutagenu do DNA. Dodatkowo, doktorantowi udało się zademonstrować ochronną rolę kofeiny przed mutacjami wywołanymi przez ICR191 w DNA bakterii. Ochrona ta była tym większa, im wyższe było stężenie metyloksantyny. Ponadto istotny był czas podania mutagenu oraz metyloksantyny – maksymalną ochronę obserwowano, gdy oba związki podawane były jednocześnie; podanie kofeiny po 4 godzinach od podania ICR191 właściwie niwelowało jej efekt ochronny. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie na temat kinetyki tworzenia kompleksów mutagen-DNA oraz mutagen-metyloksantyna, co w opublikowanej pracy w zasadzie nie było badane. Dlaczego w przypadku doświadczeń na komórkach eukariotycznych czas inkubacji z ICR191 i metyloksantyną wynosił 10 minut, podczas gdy w przypadku doświadczeń na bakteriach czasy inkubacji sięgały kilku godzin?

Następna z prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poświęcona jest oddziaływaniu doksorubicyny z syntetyczną metyloksantyną, pentoksyfiliną. Dodatkowym czynnikiem, komplikującym analizę w tym przypadku, jest zdolność doksorubicyny do tworzenia homodimerów. Z tego powodu przy rozważaniach nad procesami zachodzącymi w układzie DNA:doksorubicyna:pentoksyfilina uwzględnić należy obecność wolnej formy leku

(monomeru), doksorubicyny zdimeryzowanej, związanej z DNA, a także związanej w kompleksie z pentoksyfiliną. Niewątpliwym osiągnięciem Autora rozprawy jest sformułowanie nowego modelu matematycznego pozwalającego na dokonanie analizy takiej czteroskładnikowej mieszaniny. Poprawność modelu została zweryfikowana, osiągnięto wysoką zgodność z danymi eksperymentalnymi. Wykazano, że utworzenie kompleksu doksorubicyna-pentoksyfilina powoduje spadek zarówno ilości wolnej jak i zdimeryzowanej doksorubicyny, a także doksorubicyny związanej z DNA, czyli że cząsteczki pentoksyfiliny mogą przechwytywać cząsteczki leku antynowotworowego, przejściowo redukując jego zdolność do oddziaływania z DNA. Zjawisko to może znaleźć zastosowanie w ochronie komórek nienowotworowych (np. znajdujących się w pobliżu miejsca podania leku do organizmu) przed niekorzystnym działaniem doksorubicyny.

W kolejnej pracy mgr Gołuński i współpracownicy postawili sobie za cel przebadanie wpływu pentoksyfiliny na efekty biologiczne wywołane przez doksorubicynę zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. W komórkach bakteryjnych wykazano ochronną rolę pentoksyfiliny przed mutacjami wywołanymi przez doksorubicynę. Ilość zaobserwowanych mutacji była liniowo skorelowana ze stężeniem wolnej formy leku, wyliczonej przy użyciu modelu matematycznego skonstruowanego w poprzedniej pracy. Ciekawą obserwacją był fakt, że ochronna rola pentoksyfiliny zmniejszała się wraz ze wzrostem czasu inkubacji komórek z mieszaniną doksorubicyna-pentoksyfilina, co może świadczyć o przejściowym charakterze kompleksów leku z metyloksantyną i uwalnianiu z nich wolnej doksorubicyny po pewnym czasie. W dalszej części pracy badano wpływ pentoksyfiliny na cytotoksyczność doksorubicyny w komórkach eukariotycznych (linie komórkowe HaCaT oraz MCF-7 i MEL-Juso). Nie jest dla mnie jasne, czym kierował się Autor przy wyborze linii komórkowych do eksperymentów. Oprócz tego twierdzenie, że pentoksyfilina redukuje cytotoksyczność doksorubicyny jedynie w komórkach nienowotworowych, przy braku podobnego efektu w komórkach nowotworowych, jedynie na podstawie wyników osiągniętych w trzech liniach komórkowych, wydaje mi się zbytnią generalizacją. Brakuje mi także próby wyjaśnienia przyczyn różnic w działaniu pentoksyfiliny zaobserwowanych pomiędzy komórkami HaCaT oraz MCF-7 i MEL-Juso. Autorzy wykazali także, że pentoksyfilina redukuje liczbę komórek HaCaT zatrzymanych, na skutek działania doksorubicyny, w punkcie kontrolnym G₂/M cyklu komórkowego, a także obniża wewnątrzkomórkową fluorescencję doksorubicyny. Mechanizm tego ostatniego efektu nie został jednak precyzyjnie wyjaśniony. Czy był on spowodowany np. zmniejszoną akumulacją leku w komórkach HaCaT w obecności pentoksyfiliny, czy też wygaszeniem fluorescencji doksorubicyny po utworzeniu kompleksu z metyloksantyną?

Ostatnia praca cyklu tworzącego rozprawę doktorską poświęcona jest wpływowi pentoksyfiliny na oddziaływanie innego antybiotyku antracyklinowego, idarubicyny, z DNA. Stanowi ona pierwszą próbę scharakteryzowania powstawania kompleksów idarubicyny z DNA

i z metyloksantyną przy wykorzystaniu metod biofizycznych i obliczeniowych. Doktorantowi udało się wykazać, że pentoksyfilina wiąże się z idarubicyną obniżając w ten sposób jej zdolność do oddziaływania z DNA, a także biodostępność leku. Ponadto, metyloksantyna zmniejsza aktywność mutagenną idarubicyny w komórkach bakteryjnych.

Uzupełnienie czterech opublikowanych artykułów stanowią Wstęp i Podsumowanie, napisane w języku polskim. Część wstępna pracy, mimo że niedługa, dobrze wprowadza czytelnika w omawiane zagadnienia. Podsumowanie wypunktowuje najważniejsze wyniki osiągnięte w ramach pracy doktorskiej. Niestety w tych częściach pracy mgr Gołuński nie ustrzegł się drobnych błędów, wynikających głównie z niestaranności w procesie redakcji pracy. Już pierwsze zdanie Streszczenia, cytuję „Jedną z ich bardziej znaczących grup są ligandy aromatyczne...” wprowadza czytelnika w atmosferę tajemnicy, bowiem musi on samodzielnie rozwikłać zagadkę, co określa zaimek „ich”. Mój stanowczy protest budzi również brak odmiany nazwisk w nazwach stosowanych modeli matematycznych. Sformułowania, takie jak „model Kapuściński-Kimmel” czy „model Zdunek *et al.*” są sprzeczne z duchem języka polskiego, który w takich wypadkach wymaga umieszczenia nazwisk w formie dopełniacza. Powinno być „model Kapuścińskiego i Kimmela” oraz, analogicznie, „model Zdunka i współpracowników”. Obowiązuje tu ta sama zasada, zgodnie z którą mówimy o prawie Newtona, a w przyszłości – być może – będziemy mówić o twierdzeniu Gołuńskiego.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską mgr. Grzegorza Gołuńskiego oceniam bardzo wysoko. Autorowi udało się zrealizować postawione sobie cele naukowe. Na trzech badanych parach: ligand aromatyczny-metyloksantyna wykazał, że metyloksantyny mogą przechwytywać cząsteczki ligandów, tworząc z nimi kompleksy i, tym samym, przejściowo redukując ich zdolność do wiązania się z DNA. Skutkuje to obniżeniem aktywności mutagennej badanych związków aromatycznych w komórkach prokariotycznych, a także wywiera efekt ochronny w komórkach eukariotycznych (redukcja cytotoksyczności antracyklin, osłabienie ich wpływu na cykl komórkowy). Autor udowodnił, że spośród istniejących modeli opisujących oddziaływanie ligandów aromatycznych z metyloksantynami, model zakładający przechwytywanie cząsteczek ligandów i wiązanie ich w kompleksach heterocyklicznych z metyloksantyną lepiej odpowiada rzeczywistości. Ważnym osiągnięciem Doktoranta jest również opracowanie nowego modelu statystyczno-dynamicznego umożliwiającego analizę oddziaływania metyloksantyn z lekami przeciwnowotworowym, które posiadają zdolność do dimeryzacji, oraz z DNA.

W mojej ocenie prezentowana rozprawa doktorska stanowi samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorant wykazał się również odpowiednią wiedzą

w wybranej dziedzinie naukowej i udowodnił, że potrafi jasno stawiać sobie cele badawcze, planować ich realizację oraz skutecznie je realizować.

Dodatkowo należy podkreślić, że dorobek naukowy mgr. Grzegorza Gołuńskiego (poza rozprawą doktorską) jest imponujący jak na osobę dopiero rozpoczynającą karierę naukową i obejmuje dziewięć publikacji pełnotekstowych (sumaryczny IF 22,487, pkt. MNiSW 205) oraz 24 doniesienia konferencyjne. Ponadto Doktorant trzykrotnie otrzymywał dofinansowanie w ramach Projektów dla Młodych Naukowców i Doktorantów.

Wnioski końcowe

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa pt. „Metyloksantyny jako modulatory antybiotyków antracyklinowych i aromatycznych mutagenów – analiza oddziaływań z DNA oraz aktywności biologicznej” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr. Grzegorza Gołuńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

