

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Adama Osowskiego p.t. „Wybrane stilbeny, katechiny i ksantyny jako związki przechwytyjące interkalatory DNA”

Duże zainteresowanie naturalnymi związkami polifenolowymi i purynowymi wynika przede wszystkim z wykazanych w wielu badaniach *in vitro* i *in vivo* ich właściwości prozdrowotnych. Dieta bogata w te związki, a w szczególności w związki polifenolowe zapobiega powstawaniu szeregu chorób, m.in. chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, chorób neurodegeneracyjnych. Ich działanie wynika z silnych właściwości antyoksydacyjnych, stymulowania ekspresji i aktywacji wielu białek np. sirtuin, oraz zapobieganiu potranslacyjnym modyfikacjom białek i modyfikacjom DNA itp.

Działanie wielu niskocząsteczkowych związków przeciwnowotworowych takich jak: doksorubicyna, mitoksantron, polega na wiązaniu się z DNA. Leki przeciwnowotworowe na ogół nie działają selektywnie i mają niepożądane uboczne działanie, gdyż uszkadzają również komórki tkanek prawidłowych.

Udowodniono, że wiele naturalnie występujących związków fenolowych i purynowych wiąże się z lekami przeciwnowotworowymi i w konsekwencji może chronić komórki prawidłowe przed cytotoksycznym i genotoksycznym działaniem tych leków. W tym aspekcie dokładne poznanie mechanizmów oddziaływania naturalnych związków fenolowych i purynowych ma duże znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. W tę tematykę wpisuje się rozprawa doktorska mgr. Adama Osowskiego, który badał wiązanie rezweratrolu, kwercetyny oraz wybranych katechin i ksantyn z dwoma interkalatorami DNA – oranżem akrydyny i mitoksantronem.

Praca została wykonana w Katedrze Fizyki i Biofizyki UWM – w bardzo dobrym ośrodku naukowym specjalizującym się w badaniach oddziaływań biomolekuł głównie metodami spektrofotometrycznymi i spektrofluorymetrycznymi. Praca została zrealizowana pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Zbigniewa Wieczorka i promotora pomocniczego dr. hab. Mariusza Szabelskiego.

Przedstawiona do oceny rozprawa składa się ze skromnej liczby dwóch opublikowanych prac, które zostały poprzedzone obszerniejszym ich omówieniem. Prace zostały opublikowane w

renomowanych czasopismach naukowych z listy *JCR: Journal of Toxicology and Environmental Health* oraz *Food Chemistry*, którym przypisany jest stopień oddziaływania **IF** odpowiednio **2,243** i **4,052**. Sumaryczny IF prac jest więc stosunkowo wysoki i wynosi **6,295**. Prace są wieloautorskie. Do przedstawionych dokumentów dołączono oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstaniu publikacji. Chociaż nie jest to wymagane, to szkoda, że w oświadczeniach nie określono tego udziału liczbowo (w procentach) co ułatwiłoby oszacowanie wkładu mgr. A. Osowskiego w powstaniu prac. Jednakże w obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem, można więc domniemywać, że Jego udział jest znaczący.

Celem pracy doktorskiej mgr. Adama Osowskiego było określenie stopnia wiązania się naturalnie występujących pochodnych związków fenolowych i pochodnych purynowych z dwoma interkalatorami DNA: oranżem akrydyny i mitoksantronem. Cel pracy został dobrze sformułowany, a odpowiednio dobrane metody, pozwoliły na realizację postawionych zadań.

W przypadku oranżu akrydyny badano jego oddziaływanie z rezweratrolem, adenozyną oraz ksantynami: kofeiną, teofiliną i teobrominą (*Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2010; **73**: 1141-1149). Stałe asocjacji kompleksów określano na podstawie zmian w widmach absorpcyjnych i fluorescencyjnych. Stałe wyznaczone obiema metodami były w przybliżeniu takie same, co świadczy o poprawnym przeprowadzeniu doświadczeń. W pracy wykazano, że stałe asocjacji ksantyn z oranżem akrydyny są stosunkowo niskie –ponad 100 i 2000 razy mniejsze niż stałe odpowiednio z rezweratrolem i chlorofiliną. W konsekwencji dla wiązania 50% tego interkalatora o stężeniu $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ potrzebne jest 20-krotnie większe stężenie rezweratrolu i aż 3 do 4 rzędy wielkości większe stężenie ksantyn. Tak więc ksantyny posiadają względnie niskie właściwości przechwytyjące interkalatory DNA biorąc pod uwagę, że stała asocjacji oranżu akrydyny z DNA jest około 3 rzędy wielkości większa od stałej wiązania ksantyn z oranżem akrydyny.

Mam dwie drobne uwagi do tej pracy. Trudno mi się zgodzić z twierdzeniem autorów pracy, że zmiany widm absorpcyjnych oranżu akrydyny miareczkowane ksantynami nie były znaczące, skoro maksimum absorpcji przesunęło się znacząco w stronę fal dłuższych, a widma różnicowe z wyraźnym punktem izobestycznym były zmierzone z dobrą dokładnością. Nie podano interpretacji wzrostu natężenia fluorescencji i gaszenia fluorescencji oranżu akrydyny miareczkowanego odpowiednio ksantynami i rezweratrolem.

W drugiej pracy badano wiązanie mitoksantronu z wybranymi naturalnie występującymi flawonoidami: rezweratrolem, kwercetyną, katechiną, galusanem epigallokatechiny oraz rutyną (*Food Chemistry*, 2017, **227**, 142-148). Ta grupa związków różni od badanych w poprzedniej pracy

występowaniem znacznej ilości grup OH. Badanie wiązania tych polifenoli z mitoksantronem jest bardzo ważne, gdyż mitoksantron stosowany jest w medycynie m.in. jako lek przeciwnowotworowy oraz w leczeniu stwardnienia rozsianego. Lek ten wykazuje dużą cytotoksyczność i powoduje wiele niepożądanych efektów. Cechuje go przede wszystkim duża kardiotoxyczność. Poszukuje się więc nowych preparatów, które niwelowałyby ogólnotoksyczne działanie mitoksantronu, wynikające m.in. z generowania reaktywnych form tlenu powstających podczas metabolizmu leku. Takimi związkami mogą być naturalnie występujące polifenole, które mogą wiązać się z lekiem i jednocześnie posiadają duże właściwości antyoksydacyjne. Aby je stosować należy jednak dokładnie poznać mechanizmy ich działania na poziomie molekularnym, komórek i organizmów oraz ustalić bezpieczne dawki ich stosowania. W ten nurt ważnych badań wpisuje się ww. dysertacja.

Praca jest bardzo starannie wykonana i opracowana, a metodyka prawidłowo dobrana. Badane związki obniżały absorbancję mitoksantronu i powodowały przesunięcie maksimum widma oraz gasiły fluorescencję mitoksantronu. Wartości stałej asocjacji wyznaczone na podstawie widm absorpcyjnych i fluorymetrycznych są w przybliżeniu takie same. Autorzy wykazali, że spośród badanych polifenoli najwyższą stałą wiązania z mitoksantronem wykazuje kwercetyna ($1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), a najniższą rezweratrol. Określili również mechanizm gaszenia fluorescencji mitoksantronu oznaczając czasy życia metodą czasowo rozdzielczej fluorymetrii. Na podstawie wykonanych pomiarów wnioskowali, że proces tworzenia asocjacji rutyny i katechiny z mitoksantronem przebiega w stanie podstawowym i odpowiada statycznemu procesowi gaszenia. Natomiast gaszenie fluorescencji mitoksantronu przez kwercetynę, rezweratrol i epigallokatechinę zachodzi na drodze zarówno statycznej jak i dynamicznej. Proces wiązania zachodzi jednak głównie w stanie podstawowym.

Chociaż stała równowagi wiązania mitoksantronu z DNA jest ok 600 razy wyższa niż stała wiązania z kwercetyną, to przy odpowiednio wysokich stężeniach flawonol ten może spełniać rolę dobrego „przechwytywacza” tego leku. W pracy poddano więc analizie także widmo fluorescencji mitoksantronu (MT) w układzie trójskładnikowym MT-DNA-kwercetyna. Dodanie kwercetyny do roztworu DNA-MT powodowało dalsze gaszenie fluorescencji co według autorów świadczyło o tworzeniu się niefluoryzujących kompleksów typu MT-kwercetyna. Oznaczało to, zdaniem Autorów, że stała równowagi przesunęła się tak, iż część cząsteczek MT odłącza się od DNA wiążąc się kwercetyną. Uważam, że taki wniosek należałoby poprzeć dodatkowymi badaniami. Zagadnienie to zostało przebadane w bardzo ograniczonym zakresie, a rezultaty przedstawiono jedynie w postaci trzech widm emisyjnych.

Mam jedno pytanie metodyczne do Doktoranta. Jak określano stężenia badanych związków potrzebne do związania określonego ułamka (np. 50%) mitoksantronu lub oranżu akrydyny? Nie znalazłem tej informacji ani w publikacjach, ani w dołączonym opracowaniu.

Uważam, że przedstawione do oceny prace są cenne, mają jednak charakter badań podstawowych. Ich aplikacyjne znaczenie jest niewielkie, gdyż badane związki w komórce mogą wiązać się kompetycyjnie nie tylko z lekami, będącymi interkalatorami DNA, ale również bardzo efektywnie z innymi cząsteczkami np. z wieloma białkami, których zawartość komórce przewyższa znacznie zawartość DNA. Należałoby więc przebadać jak zachodzi wiązanie związków fenolowych z interkalatorami w komórce, co oczywiście nie jest proste do wykonania.

Sądzę, że rozszerzenie badań o metody kalorymetryczne i modelowanie narzędziami bioinformatycznymi wniosłoby wiele wartościowych informacji dotyczących badanych zagadnień.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że praca dotyczy bardzo aktualnej problematyki i wnosi nowe, istotne informacje dotyczące oddziaływania naturalnie występujących związków fenolowych i purynowych z interkalatorami DNA. Doktorant posługuje się w swojej pracy nowoczesnymi technikami badań biofizycznych. Uważam, że wytyczony cel pracy został przez Doktoranta osiągnięty.

Przedstawiona mi do oceny praca w postaci publikacji pod ogólnym tytułem. „*Wybrane stilbeny, katechiny i ksantyny jako związki przechwytyjące interkalatory DNA*” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 ze zm.), wnoszę więc o dopuszczenie mgr Adama Osowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Mieczysław Puchała