



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 08 kwietnia 2019 r.

Prof. dr hab. Tomasz Śliwiński
Kierownik Pracowni Genetyki Medycznej
Katedra Genetyki Molekularnej UŁ

O c e n a

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Galczyńskiej

pt.: *„Ocena właściwości biologicznych kompleksów niklu(II), kobaltu(II) i miedzi(II) z pochodnymi imidazolu”*

Chemioterapeutyków obecnej generacji, stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych, pomimo wielu sukcesów klinicznych, nie można uznać jako doskonałych. Większość z nich nie działa wybiórczo, ale dodatkowo uszkadza komórki i tkanki prawidłowe tj. szpik, komórki nabłonkowe oraz komórki układu immunologicznego, czy gamety. Powstałe uszkodzenia prowadzą do wielu schorzeń i defektów organizmu tj. pancytopenia czy osłabienie układu odpornościowego, jak również powodują powstawanie mutacji w DNA.

Także rosnąca oporność bakterii czy grzybów na dostępne obecnie antybiotyki zmusza do poszukiwania nowych związków przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych, a także cząsteczek hamujących ich aktywność.

Pomocne w eliminacji wymienionych zagrożeń człowieka mogą okazać się kompleksy metali przejściowych. Są one ważną grupą związków chemicznych ze względu na ich zdolność do tworzenia dodatkowych wiązań z różnymi biomolekułami. Można je zatem zaklasyfikować jako grupy związków pomocnych w projektowaniu nowych farmaceutyków. W ciągu ostatnich kilkunastu lat dużym zainteresowaniem cieszą się badania nad właściwościami biologicznymi kompleksów metali przejściowych, w tym kompleksów z pochodnymi imidazolu.

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na to, że kompleksy metali z pochodnymi imidazolu posiadają m.in. właściwości przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe.

Pracownia Genetyki Medycznej, Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143 12/16, 90-236 Łódź, tel. (42) 635 44 86, fax (42) 635 44 84

Kierownik Pracowni: prof. dr hab. Tomasz Śliwiński
tel. (42) 635 44 86, e-mail: tomasz.sliwinski@biol.uni.lodz.pl

Bardzo istotnym zatem jest prowadzenie badań w kontekście poszukiwania nowych kompleksów tego typu, które mogą poszerzyć grupę związków działających na aktywność biologiczną komórek. Pozwoli to w przyszłości na zastosowanie odpowiedniej liczby leków podczas wdrażania terapii spersonalizowanej wielu chorób oraz zakażeń człowieka. Dlatego też, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W części pogładowej (27 stron) Doktorantka zwięźle opisała zagadnienia pozostające tematyczne w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Wśród nich, po wprowadzeniu dotyczącym wybranych właściwości biologiczne kompleksów metali tj. cytotoksyczności kompleksów metali w komórkach eukariotycznych, mgr Katarzyna Gałczyńska opisała reakcje wolnorodnikowe oraz oddziaływania kompleksów metali z DNA. W dalszej części Doktorantka przedstawiła właściwości przeciwbakteryjne oraz przeciwgrzybicze kompleksów niklu(II), kobaltu(II) i miedzi(II) z pochodnymi imidazolu. Na zakończenie Autorka przedstawiła wybrane właściwości biofizyczne kompleksów metali. Informacje zawarte w tej części rozprawy oraz sposób ich przedstawienia świadczą o bardzo ugruntowanej, szerokiej wiedzy mgr Katarzyny Gałczyńskiej i mogą one stanowić materiał do napisania doskonałej pracy przeglądowej. Część ta została poparta, bardzo dobrze dobranymi, bardzo aktualnymi 226 pozycjami literaturowymi. Głównym celem pracy była ocena wybranych właściwości biologicznych kompleksów niklu(II), kobaltu(II) oraz miedzi(II) z pochodnymi imidazolu. Na realizację tego celu składały się pomocnicze cele szczegółowe tj.

- Analiza cytotoksyczności powyższych kompleksów niklu(II), kobaltu(II) oraz miedzi(II) z pochodnymi imidazolu wobec dwóch linii komórkowych BEAS-2B oraz A549 z zastosowaniem testu MTT i cytometrii przepływowej.
- Analiza właściwości biofizycznych powyższych kompleksów tj. oddziaływanie z DNA z zastosowaniem techniki HRM-PCR, oddziaływanie z białkami z wykorzystaniem metody wygaszania fluorescencji BSA oraz techniki dichroizmu kołowego, analiza aktywności enzymatycznej z wykorzystaniem technik spektrofotometrycznych, jak również analizę interferometryczną dyfuzji badanych kompleksów przez monowarstwę komórkową.
- Ocena właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych powyższych kompleksów wobec bakteryjnych szczepów wzorcowych *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* oraz grzybowych *C. albicans* z wykorzystaniem mikrobiologicznych technik hodowlanych.

Podczas realizacji zadań badawczych mgr Katarzyna Gałczyńska opanowała i zastosowała szereg metod wymagających wiedzy, precyzji i czasu. Znalazły się wśród nich: prowadzenie hodowli eukariotycznych linii komórkowych, ocena cytotoxycności badanych związków za pomocą testu MTT oraz za pomocą cytometrii przepływowej. Podczas analizy właściwości biofizycznych Doktorantka wykorzystwała: do określenia oddziaływania kompleksów z DNA - technikę PCR-HRM, do oddziaływania z białkiem (lizozym, endolizyny, BSA) wpływu na strukturę - dichroizm kołowy, do oceny aktywności enzymatycznej białek – spektroskopię fluorescencyjną oraz do oceny dyfuzji kompleksów przez monowarstwę komórek CHO-K1 - interferometrię laserową. Godne podkreślenia jest to, iż podczas realizacji zadań badawczych mgr Katarzyna Gałczyńska zastosowała w sposób nowatorski metodę PCR-HRM pozwalającą na ocenę uszkodzeń DNA oraz technikę interferometrii laserowej dedykowaną do analizy ewolucji warstwy stężeniowej oraz parametrów dyfuzji związków chemicznych przez monowarstwę komórek eukariotycznych.

Właściwie zaplanowany projekt badawczy i jego konsekwentna realizacja z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod, wnikliwa statystyczna ocena otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, m.in.

- kompleksy $[\text{Ni}(\text{1-allim})_6](\text{NO}_3)_2$ i $[\text{Cu}(\text{1-allim})_4](\text{NO}_3)_2$ są cytotoxyczne wobec komórek nowotworowych A549 w niższym stężeniu niż wobec prawidłowych komórek BEAS-2B,
- wszystkie analizowane metale w formie kompleksów z pochodnymi imidazolu tj. anionem kwasu 4-imidazoloctowego lub 1-alliloimidazolem efektywniej dyfundują przez monowarstwę komórek CHO-K1 niż ich sole,
- kompleksy $[\text{Ni}(\text{iaa})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, $[\text{Ni}(\text{1-allim})_6](\text{NO}_3)_2$, $[\text{Co}(\text{1-allim})_6](\text{NO}_3)_2$, w przeciwieństwie do kompleksów Cu(II), posiadają właściwości przeciwwgrzybicze na poziomie zbliżonym do soli metali w stężeniach niecytotoxycznych w stosunku do komórek eukariotycznych A549 oraz BEAS-2B.
- badane kompleksy metali nie wykazują właściwości przeciwbakteryjnych wobec *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* w stężeniach niecytotoxycznych w stosunku do komórek eukariotycznych A549 oraz BEAS-2B.

Wyniki badań własnych Doktorantka zilustrowała za pomocą bardzo czytelnych, dobrze wykonanych 36 rycin i jasno opisanych 11 tabel. Bardzo dobre i czytelne przedstawienie uzyskanych przez Doktorantkę wyników świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki recenzowanej rozprawy doktorskiej. Właściwy i jasny wykaz skrótów pozwala na łatwe zapoznawanie z treścią zawartą w ocenianej pracy.

Dyskusja jest bardzo silną stroną rozprawy. Doktorantka analizuje dogłębnie uzyskane wyniki, porównuje z wynikami podobnych badań wykonanych w innych ośrodkach, rozważa mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (110 str.) jest godne podkreślenia. W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam swoje uwagi oraz sugestie:

- Chciałbym aby Doktorantka zaproponowała, podczas obrony, potencjalny mechanizm hamowania aktywności enzymatycznej białek degradujących peptydoglikan inkubowanych z kompleksami metali przejściowych z pochodnymi imidiazolu. Jest to istotne w świetle uzyskanej, w wyniku przeprowadzonych badań, informacji, iż kompleksy te nie wpływają na strukturę drugorzędową tych białek.
- Może warto by było zbadać, za pomocą metod krystalograficznych, czy opisywane kompleksy metali przejściowych nie zmieniają struktury centrum aktywnego badanych białek.
- Czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych badań, skoncentrowanych na komórkach innych typów nowotworów złośliwych, które mogłyby w przyszłości wpłynąć na opracowywanie nowoczesnych terapii przeciwnowotworowych?

Praca ta jest bardzo dobrym przykładem samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, który w przyszłości może zaowocować stworzeniem nowych, przeciwnowotworowych strategii terapeutycznych, a także zaprojektowaniem nowych leków przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych.

Ta bardzo dobra praca doktorska jest owocem wysiłku włożonego przez jej promotora prof. Michała Arabskiego oraz Doktorantkę.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Uwzględniając nietuzinkowe koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładam do Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach wnioski o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Gałczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wybitnie nowatorski i nieprzeciętny charakter tej dysertacji oraz wykorzystanie dotychczas stosowanych metod analitycznych do nowych zastosowań biochemiczno-biofizycznych, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

KIEROWNIK
PRACOWNI GENETYKI MEDYCZNEJ
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ

prof. dr hab. Tomasz Sliwiński