

**Prof. dr hab. Dorota Nowak**

Wrocław, 25. 04.2024

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. inż. Piotra Grześkowiaka pt.
„Synthesis and evaluation in vitro of novel arginine analogues as
potential new components of metabolic anticancer therapy”**

Arginina, jeden z aminokwasów zasadowych, stanowi element budulcowy białek komórkowych. Jest ponadto substratem w syntezie wielu cząsteczek o ważnej roli biologicznej pełnionej w organizmie człowieka. Należą do nich aminokwasy takie jak ornityna, prolina, kwas glutaminowy czy glutamina, ponadto tlenek azotu, poliaminy oraz kreatyna. W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie rolą argininy w progresji nowotworowej. Aminokwas ten okazał się bowiem niezbędny dla wzrostu komórek nowotworowych ponieważ odgrywa znaczącą rolę w przebiegu szlaków metabolicznych mających związek z nowotworzeniem. Wykazano, że wiele komórek nowotworowych nie posiada zdolności syntezy argininy, stąd możliwość proponowania nowych strategii terapeutycznych polegających na celowym zaburzaniu metabolizmu nowotworu poprzez traktowanie pacjentów pochodnymi tego aminokwasu, które nie wykazują stymulującego wpływu na progresję. Dlatego też temat podejmowany w pracy doktorskiej mgr. inż. Piotra Grześkowiaka jest aktualny i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana pod promotorstwem prof. dr hab. Marii Jolanty Rędownicz z Pracowni Molekularnych Podstaw Ruchów Komórkowych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN oraz dr hab. Marioli Koszytkowskiej-Stawińskiej, prof. PW z Katedry Chemii Organicznej Politechniki Warszawskiej. Warto zaznaczyć, że praca doktorska powstała w ramach interdyscyplinarnych studiów

doktoranckich – TRI-BIO-CHEM finansowanych w latach 2014-2020 ze środków Projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

Oceniana przeze mnie dysertacja liczy 146 stron, w tekście zamieszczono 53 ryciny i 10 tabel, a na jej końcu został umieszczony suplement zawierający wzory chemiczne i struktury używanych związków. W pracy doktorskiej zacytowano 92 publikacje, z czego 17% pochodzi z ostatnich pięciu lat.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Piotra Grześkowiaka ma układ typowy dla tego typu opracowań, z tą różnicą, że została w niej odrębnie wydzielona część poświęcona używanym narzędziom badawczym - „Tools” oraz metodyce - „Methods”. W 13 stronicowym „Wstępie” Autor przedstawił zagadnienia przybliżające temat i ułatwiające czytelnikowi zrozumienie całości pracy. Jest to bardzo istotna część rozprawy ze względu na jej interdyscyplinarny charakter, obejmujący zarówno nauki chemiczne jak i biologiczne. Doktorant zawarł zatem w tej części informacje dotyczące roli argininy w budowie białek, przemian metabolicznych tego aminokwasu oraz śmierci komórki. Zwrócił również uwagę na postulowaną w ostatnich latach rolę tej cząsteczki w progresji nowotworowej. Zakres informacji zawartych we wstępie nie jest rozbudowany, zawiera raczej podstawowe dane, ale jest adekwatny do opisanych później wyników i nie zawiera zbędnych wątków.

Celem badań prowadzonych w ramach ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej było zaprojektowanie, synteza i charakterystyka aktywności biologicznej pochodnych argininy, które mogłyby mieć potencjał przeciwnowotworowy.

Pierwszym etapem pracy były badania *in silico* dotyczące modelowania przestrzennego cząsteczek z zastosowaniem strategii RDD - „rational drug design”. Na tym etapie Autor zaprojektował trzy grupy pochodnych argininy, zawierające w sumie 43 związki. Były to:

- 1- analogiz pierścieniem 1H-1,2,3-triazolowym w łańcuchu bocznym cząsteczki,
- 2- wybrane naturalne lub syntetyczne aminokwasy z alifatycznymi łańcuchami bocznymi,
- 3- pochodne argininy zawierające podjednostki 1H-1,2,3-triazolu oraz triazolu jako bioizostery guaniny.

Wszystkie zaprojektowane związki zostały zaprezentowane w tabelach 2,3 i 4.

Drugim etapem badań była synteza najbardziej obiecujących analogów argininy. Strategie prowadzonych syntez przedstawione zostały na przejrzystych diagramach.

Trzeci etap wykonanych eksperymentów dotyczył aktywności biologicznej początkowo wybranych czterech, a finalnie jednego analogu argininy. Modelem badawczym w części biologicznej pracy doktorskiej były dwie linie ludzkiego glejaka – U251MG oraz U87MG. W celu określenia skuteczności syntetyzowanych związków przeprowadzone zostały testy żywotności komórek oraz zmian w ich morfologii w mikroskopie świetlnym w warunkach hodowli w pełnej pożywce oraz pozbawionej argininy. Ponadto Doktorant posługując się techniką Western Blotting wykonał analizy mające na celu immunologiczną identyfikację markerów apoptozy, takich jak kaspaza-3 i -9 oraz PARP1.

Ta ostatnia część pracy doktorskiej zakończyła się wytypowaniem jednego z analogów argininy określanego jako 2a, który posiada potencjał do dalszych badań zmierzających do stworzenia strategii terapeutycznej wspierającej chemioterapię.

W tym miejscu oceny pracy doktorskiej chciałabym wyrazić swoje uwagi w kilku kwestiach, które, mam nadzieję, może uwzględnić i odnieść się do nich Doktorant w czasie publicznej obrony.

1. Sporym mankamentem w odbiorze wyników w części biologicznej pracy jest rozmiar wykresów i rycin mikroskopowych. Format A5 dysertacji wymagałby jednak dodatkowych materiałów przekazanych recenzentom na nośniku elektronicznym.

2. Pod wykresami przedstawiającymi żywotność komórek brakuje informacji o liczbie powtórzeń czy istotności statystycznej. To budzi wątpliwość tym bardziej, że w tekście na str. 61 znajduje się zapis, że badania te obejmują trzy powtórzenia biologiczne w trzech technicznych replikatach, a w opisie metod na str. 94 jest mowa tylko o powtórzeniach technicznych. To bardzo istotna informacja ponieważ powtórzenia techniczne sprawdzają jedynie powtarzalność dokonywanych pomiarów, nie można na ich podstawie wnioskować, co do skuteczności badanych związków. W badaniach biologicznych wielokrotność powtarzanych eksperymentów ma bowiem istotny wpływ na poprawność formułowanych konkluzji.

3. Z eksperymentów wykonanych techniką Western blotting wynika, że w lizatach wyizolowanych z komórek obydwu linii glejaka, pomimo widocznej w niektórych próbach obecności kaspazy 3, nie zaobserwowano obecności cząsteczki PARP1, której działanie jest ściśle związane z aktywnością kaspazy 3. Jaki mógłby być w takim razie mechanizm śmierci komórek traktowanych wybranym analogiem argininy? Ile powtórzeń eksperymentów metodą Western blotting wykonano?

4. Morfologia komórek traktowanych analogiem argininy była oceniana poprzez obserwacje w mikroskopie świetlnym. W pracy doktorskiej zamieszczono, co oczywiste, wybrane ryciny, jednak chciałabym zapytać o liczbę obrazów, na podstawie których były formułowane wnioski dotyczące obserwowanych zmian kształtu komórek.

Ostatnią częścią ocenianej przeze mnie pracy jest czterostronicowa „Dyskusja” oraz wnioski podsumowujące. W rozdziale tym Autor omawia syntetycznie i podsumowuje uzyskane przez siebie rezultaty. Brakuje mi nieco w tej części odniesienia do innych badań prowadzonych bardzo intensywnie w ostatnich latach nad zastosowaniem pochodnych argininy w strategiach terapeutycznych w przypadku różnych nowotworów.

Oceniana przeze mnie praca doktorska została napisana poprawnym językiem angielskim i starannie opracowana pod względem edytorskim, poza wspomnianymi problemami z wielkością rycin w części biologicznej. Stanowi ona bardzo ciekawe połączenie badań prowadzonych *in silico* oraz danych eksperymentalnych, będących połączeniem metodyki typowej dla nauk chemicznych i biologicznych. To trudne zadanie, którego podjął się i zrealizował Doktorant.

Analizując dorobek publikacyjny pana mgr. inż. Piotra Grześkowiaka stwierdzam, że jest On współautorem czterech publikacji. Dwie z tych prac ukazały się w czasopiśmie *Bioorganic Chemistry* (IF 5,2), zaś pozostałe w *Frontiers in Microbiology* (IF 4,07) oraz *Journal of Power Sources* (IF 6,3). Prace te nie dotyczą zagadnień opisanych w doktoracie, ale świadczą o szerszych zainteresowaniach Doktoranta.

Reasumując, rozprawę doktorską mgr. inż. Piotra Grześkowiaka oceniam pozytywnie. W moim przekonaniu Autor uzyskał interesujące wyniki, które

posiadają potencjał i stanowią podstawę do dalszych badań. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz.1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 i 2 Ustawy z dn. 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.