

Prof. ucz. dr hab. Lech Celewicz
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii
Pracownia Chemii Nukleozydów i Nukleotydów
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

Poznań, 22 października 2019 r.

Recenzja rozprawy habilitacyjnej pt.
**„Oddziaływanie związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny
z G-kwadrupeksami DNA”**

oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego
dr Agaty Głuszyńskiej

Dr Agata Głuszyńska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu uzyskując w 1994 stopień magistra. Pracę magisterską zatytułowaną „*Reakcja Mitsunobu w układach α -ftalimidoalkoholi*” wykonała pod opieką prof. dr hab. Marii D. Rozwadowskiej. W 2001 roku dr Głuszyńska obroniła na Wydziale Chemii UAM pracę doktorską pt. „*Enancjoselektywna synteza alkaloidów izochinolinowych metodą Pomeranza-Fritscha w modyfikacji Bobbitta*”, którą również wykonała pod kierunkiem prof. Rozwadowskiej. W latach 1999-2002 dr Głuszyńska była zatrudniona na Wydziale Chemii na etacie inżynieryjno-technicznym, następnie w latach 2003-2004 odbywała podoktorski staż naukowy w Zakładzie Spektrochemii Organicznej i od roku 2005 do chwili obecnej pracuje na etacie adiunkta w Pracowni Chemii Bioanalitycznej kierowanej przez prof. dr. hab. Bernarda Juskowiaka.

Ocena osiągnięcia naukowego

Na osiągnięcie habilitacyjne dr Agaty Głuszyńskiej składa się cykl ośmiu publikacji, oznaczonych jako **H1–H8**, zaprezentowanych w Autoreferacie pod tytułem „*Oddziaływanie związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny z G-kwadrupeksami DNA*”. Publikacje te ukazały się w latach 2006–2019 w następujących czasopismach z listy *Journal Citation Reports (JCR): Polish Journal of Chemistry* (IF = 0,49), *Tetrahedron Letters* (IF = 2.62), *Chemical Papers* (IF = 1,19), *European Journal of Medicinal Chemistry* (IF = 3,90), *International Journal of Biological Macromolecules* (IF = 3,91), *Molecules* (3 publikacje, IF

= 3,10). Sumaryczna wartość wskaźnika cytowań IF dla publikacji **H1–H8** wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wynosi 21,41, czyli średnio 2,68 na publikację. Średni udział procentowy Habilitantki w pracach cyklu **H1–H8**, jest wysoki i wynosi 76%.

W publikacji **H1** (*Polish J. Chem.* 2006) przedstawiono wyniki badań nad oddziaływaniem jonowego produktu utleniania papaweryny (pochodna indolizochinolinowa, oznaczona w publikacji jako związek **2**) z dwuniciowym DNA (calf thymus) i 21-merowym oligodeoksyrybonukleotydem o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA, który tworzy G-kwadrupeksy. Jednak okazało się, że związek **2** oddziałuje mniej selektywnie z G-kwadrupeksami DNA niż wcześniej badany inny jonowy produkt utleniania papaweryny (pochodna diazadibenzofluorenylowa, związek **1**). W tej publikacji zaprezentowano też wyniki badań aktywności cytotoksycznej związków **1** i **2** w stosunku do pięciu linii ludzkich komórek nowotworowych (EPG-85, Hep-2, A-594, BM i MCF-7). Wartości parametru IC_{50} , zwłaszcza dla związku **2**, osiągają niskie wartości (dla linii BM wyznaczono $IC_{50} = 1 \mu M$, a dla linii Hep-2 wyznaczono $IC_{50} = 2 \mu M$). Jednak nie podano wyników badań aktywności cytotoksycznej dla związku referencyjnego, np. dla często stosowanej w takiej roli doksorubicyny z grupy antracyklin, która również ulega interkalacji do DNA. Przy wartościach IC_{50} brakuje też danych odchyień standardowych, które pojawiają się w tego typu publikacjach w dobrych czasopismach z dziedziny chemii medycznej. Praca **H1**, według *Web of Science Core Collection*, była cytowana 6 razy.

W publikacji **H2** (*Tetrahedron Lett.* 2010) zostały zaprezentowane wyniki badań nad syntezą pochodnych antracenu i karbazolu, które zawierały podstawnik winylo-fenyleno-oksazolinowy zlokalizowany odpowiednio w pozycji 9 antracenu i 3 karbazolu (związki **1** i **2** w publikacji). Związki te zostały specjalnie tak zaprojektowane, aby mogły zmieniać strukturę w rezultacie reakcji *cis-trans* fotoizomeryzacji. Synteza związków **1** i **2** została dobrze zaprojektowana z wykorzystaniem reakcji Wittiga w modyfikacji Arbuzowa-Hornera w jej kluczowym etapie. Chociaż, patrząc z dzisiejszej perspektywy, zastosowanie reakcji Hecka w wersji arylowania alkenów z użyciem katalizatorów palladowych prawdopodobnie byłoby bardziej korzystne. Jednak, efekty spektralne zaobserwowane w widmach absorpcji i emisji zarówno związku **1** jak i **2** w obecności dwuniciowego DNA (calf thymus) oraz 22-merowego oligonukleotydu o sekwencji telomerowej, który może tworzyć G-kwadrupeksy wewnątrzcząsteczkowe były bardzo niewielkie. Przyczyną utrudnionej interkalacji do DNA (calf thymus) i wymienionego oligonukleotydu może być słaba rozpuszczalność ligandów **1** i

2 w roztworach wodnych (brak charakteru jonowego) i ich tendencja do tworzenia asocjatów. Praca **H2** była cytowana 8 razy (w tym 3 autocytowania).

W publikacji **H3** (*Chem. Papers* 2013) zaprezentowano syntezę nowej pochodnej karbazolu, zawierającej dwa podstawniki: w pozycji 3 winylo-benzotiazoloniowy (o charakterze jonowym, dobrze wpływający na rozpuszczalność związku w roztworach wodnych i jego właściwości fluorescencyjne) i w pozycji 9 butylo-triazolowy (związek jest oznaczony w publikacji jako **VI**). W kluczowym etapie syntezy związku **VI** wykorzystano reakcję kondensacji Knoevenagela 3-aldehydowej pochodnej karbazolu (**IV**) z pochodną 2-metylobenzotiazolu. Wykazano, na podstawie miareczkowań spektrofotometrycznych, że związek **VI** oddziałuje jako interkalator z dwuniciowym DNA (calf thymus) oraz 22-merowym oligodeoksyrybonukleotydem o sekwencji telomerowej, który tworzy G-kwadrupleksy na zasadzie „end-stackingu” (zewnętrznego stackingu, oddziaływania warstwowego). Praca **H3** była cytowana 5 razy (w tym 5 autocytowań).

Publikacja **H4** (*Eur. J. Med. Chem.* 2015) jest dobrze napisaną monoautorską pracą o charakterze przeglądowym. Dotyczy ona pochodnych karbazolu wykazujących aktywność przeciwdrobnoustrojową (przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą i przeciw pasożytniczą), przeciwnowotworową, a także mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń neurologicznych. Praca **H4** była cytowana 80 razy (w tym 4 autocytowania).

W publikacji **H5** (*Int. J. Biol. Macromol.* 2018) zaprezentowano obszerne badania nad oddziaływaniem trzech pochodnych karbazolu, które zawierały w pozycji 3 podstawnik winylo-benzotiazoloniowy i różne podstawniki w pozycji 9: etylowy (związek **1**), butylo-triazolowy (związek **2**, identyczny jak w publikacji **H3** związek **VI**) i butylo-imidazolowy (związek **3**) z 22-merowym oligodeoksyrybonukleotydem (Pu22) o sekwencji c-myc NHE III₁, zdolnym do tworzenia G-kwadrupleksów. Na podstawie badań przeprowadzonych z zastosowaniem spektroskopii UV-Vis (miareczkowanie spektrofotometryczne), fluorescencyjnej (miareczkowanie spektrofluorymetryczne), dichroizmu kołowego (CD) (wyznaczenie tzw. temperatur topnienia kompleksów) oraz modelowania molekularnego ustalono, że związki **1-3** tworzą kompleksy z G-kwadrupleksami oligonukleotydu Pu22 w stosunku 1:1 (choć kompleksy w stosunku 2:1 są też możliwe), co wskazuje na „end-stackingowy” charakter oddziaływania. Chciałbym zauważyć, że uzupełnienie badań nad kompleksami pochodnych karbazolu **1-3** z oligonukleotydem Pu22 z zastosowaniem metody magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) mogłoby znacząco wzbogacić tę pracę. Zdaje

sobie jednak sprawę, że wykonanie tego typu badań byłoby trudnym zadaniem, z uwagi na złożoność badanego układu, wymagającym nawiązania współpracy ze specjalistycznym ośrodkiem. Praca **H5** była cytowana 5 razy (w tym 3 autocytowania).

W publikacji **H6** (*Molecules* 2018, **23**, 1134) przedstawiono badania nad oddziaływaniem tych samych trzech pochodnych karbazolu co w publikacji **H5** (związki **1-3**) z G-kwadrupleksami 22-merowego oligodeoksyrybonukleotydu o sekwencji promotorowego regionu onkogenu c-KIT1. Na podstawie badań z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis, fluorescencyjnej, CD oraz modelowania molekularnego wykazano, że związki **1-3** tworzą kompleksy z G-kwadrupleksami wymienionego oligonukleotydu o porównywalnych stałych wiązania rzędu 10^5 M^{-1} , przy czym oddziaływanie ma charakter „end-stackingowy” (zewnętrznego stackingu). Praca **H6** była cytowana 5 razy (w tym 2 autocytowania).

W publikacji **H7** (*Molecules* 2018, **23**, 3154) zaprezentowano wyniki badań nad oddziaływaniem pochodnej karbazolu zawierającej w pozycji 3 podstawnik winylo-benzotiazoloniowy i w pozycji 9 butylo-imidazolowy (związek **3**, również występuje we wcześniejszych badaniach, publikacje **H5** i **H6**) z 22-merowym oligodeoksyrybonukleotydem 22HT o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA, który tworzy G-kwadrupleksy. Publikacja **H7** zawiera ulepszoną procedurę preparatyki związku **3**. Wykazano metodami spektroskopii UV-Vis, fluorescencyjnej i CD, że związek **3** w obecności kationów sodowych lub potasowych tworzy kompleksy w stosunku 2:1 z G-kwadrupleksami wymienionego oligonukleotydu o stałej wiązania rzędu 10^5 M^{-1} , przy czym oddziaływanie ma charakter „end-stackingowy”. W tej publikacji przedstawiono też wyniki badań aktywności cytotoksycznej związku **3** w stosunku do dwóch linii ludzkich komórek nowotworowych (MCF-7 i MDA-MB-231) i jednej linii komórek zdrowych (MCF-12A). Jednak, podobnie jak w publikacji **H1**, nie podano wyników badań aktywności cytotoksycznej dla związku referencyjnego. W tabeli 5, przy wartościach IC_{50} brakuje też danych odchyłeń standardowych. Praca **H7** była cytowana 2 razy (w tym 1 autocytowanie).

Publikacja **H8** (*Molecules* 2019) opisuje ulepszoną syntezę 3-formylowych pochodnych karbazolu (prekursorów w syntezie ligandów zdolnych do oddziaływania z G-kwadrupleksami oligodeoksyrybonukleotydu). Syntezę 3-formylowych pochodnych karbazolu przeprowadzono metodą Vilsmeier'a-Haack'a (reagent formylujący powstaje z dimetyloformamidem i chlorku fosforylu) z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego. Ponadto, zbadano oddziaływanie związków **3a-c** (odpowiadają one związkom **1-3** w

publikacji **H5**) metodą konkurencyjnej dializy równowagowej z siedmioma oligodeoksyrybonukleotydami, jeden z nich o sekwencji odpowiadającej ludzkiemu telomerowi (22HT) pozostałe o sekwencji odpowiadającej ludzkim protoonkogenów (c-MYC, c-KIT1, bcl-2, RET, ceb25, KRAS21), wszystkie mogą tworzyć G-kwadrupleksy. Ustalono, że związki **3a-c** oddziałują ze wszystkimi wymienionymi oligonukleotydami, lecz najsilniej z G-kwadrupleksami c-MYC. Praca **H8** nie była jeszcze cytowana.

Generalnie, należy stwierdzić, że Habilitantka przedstawiła w pracach **H1–H8** szeroki zakres badań, od syntezy ligandów antracenowych i karbazolowych (prace **H2** i **H3**), gdzie wykazała się dużym kunsztem, poprzez szeroko zakrojone badania fizykochemiczne dotyczące oddziaływania zwłaszcza ligandów karbazolowych z fragmentami DNA, które mogą tworzyć G-kwadrupleksy, wsparte badaniami teoretycznymi, po badania cytotoksyczności otrzymanych związków. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz metod badawczych zastosowanych do badania ligandów karbazolowych z G-kwadrupleksami wybranych oligonukleotydów: spektroskopia UV-Vis (miareczkowanie spektrofotometryczne), spektrofluorymetria (miareczkowanie spektrofluorymetryczne), spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), konkurencyjna dializa równowagowa i we współpracy z chemikami teoretykami modelowanie molekularne. Zwraca uwagę duży element samodzielności w prowadzonych badaniach, co dobrze rokuje na przyszłość. Habilitantka jest pierwszym autorem i zarazem autorem korespondencyjnym w prawie wszystkich publikacjach należących do serii habilitacyjnej (**H1–H8**) z jednym wyjątkiem publikacji **H1**. Podsumowując, dorobek Habilitantki zaprezentowany w pracach **H1–H8**, moim zdaniem, spełnia wymagania formalne i zwyczajowe stawiane w postępowaniach habilitacyjnych. Uważam, że publikacje stanowiące osiągnięcie habilitacyjne wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej oddziaływania ligandów organicznych, a w szczególności karbazolowych, z G-kwadrupleksami DNA.

Ocena całokształtu dorobku naukowego

Całkowity dorobek naukowy dr Agaty Głuszyńskiej, łącznie z rozprawą habilitacyjną, obejmuje 20 artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy *JCR*. Dwa artykuły ukazały się jeszcze w trakcie wykonywania pracy doktorskiej w *Tetrahedron:Asymmetry* (IF = 2,65 i 2,80), natomiast pozostałe 18 po uzyskaniu stopnia doktora. Czyli po odliczeniu ośmiu prac (**H1–H8**) wchodzących do osiągnięcia habilitacyjnego z nazwiskiem Habilitantki ukazało się jeszcze 10 publikacji w następujących

czasopismach z listy JCR: *Polish Journal of Chemistry* (IF = 0,52), *Tetrahedron: Asymmetry* (3 publikacje, IF = 2,39, 2,39 i 2,43), *Spectrochimica Acta, Part A* (IF = 1,27), *Analytica Chimica Acta* (IF = 3,19), *Journal of Inorganic Biochemistry* (2 publikacje, IF = 3,35 i 3,66), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (IF = 3,44) i *International Journal of Biological Macromolecules* (IF = 3,91). Sumaryczny Impact Factor (IF) dla 20 prac z listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 53,38, co daje średni IF na pracę 2.68. Liczba cytowań, według bazy *Web of Science* wynosi 303 (bez autocytowań 275), a Indeks Hirscha 9. W świetle powyższych danych dorobek naukowy Habilitantki należy uznać za skromny, zwłaszcza, że od momentu obrony pracy doktorskiej upłynęło 18 lat. Jednak na korzyść Habilitantki przemawia fakt, że w przeważającej liczbie są to prace na wysokim poziomie naukowym, opublikowane w renomowanych czasopismach. Ponadto, Habilitantka posiada w swoim dorobku naukowym 20 publikacji w materiałach pokonferencyjnych, rozdziałach w książkach, czasopiśmie *Wiadomości Chemiczne* itp. Habilitantka brała udział w licznych konferencjach naukowych, krajowych (39 wystąpień) i międzynarodowych (28 wystąpień). Uczestniczyła w 10 projektach badawczych, w jednym z nich była kierownikiem. Coraz częściej się zdarza wśród kandydatów do stopnia doktora habilitowanego, że nie wyjeżdżają oni na staż zagraniczny, czy chociażby krajowy w celu zdobycia szerszego spojrzenia naukowego. W przypadku dr Głuszyńskiej należy odnotować dwa, co prawda krótkoterminowe, staże naukowe w Kyushu Institute of Technology w Kitakyushu w Japonii oraz University of Michigan w Ann Arbor w USA.

Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Dr Agata Głuszyńska ma bogate doświadczenie dydaktyczne, prowadziła przez szereg lat, liczne zajęcia na Wydziale Chemii UAM były to między innymi: ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej, analizy instrumentalnej, chemii bioanalitycznej i wielu innych przedmiotów; proseminaria z chemii organicznej oraz wykłady i seminaaria z przedmiotu genetyka sądowa. Ponadto, dr Głuszyńska wypromowała trzech licencjatów, sprawowała opiekę nad kilkoma magistrantami i była promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich.

Dr Głuszyńska brała udział w organizacji dwóch konferencji naukowych, była opiekunem roku dla specjalności chemia podstawowa na Wydziale Chemii UAM w latach 2010-2015 i sprawowała indywidualną opiekę nad kilkoma studentami zagranicznymi. Od

2015 roku dr Głuszyńska bierze udział w organizacji wydarzeń popularyzujących naukę: Nocy Naukowców i Poznańskiego Festiwalu Nauki i Sztuki.

Podsumowanie

Osiągnięcia naukowe dr Agaty Głuszyńskiej zaprezentowane w publikacjach **H1–H8** oraz Autoreferacie, moim zdaniem, spełnia wymagania formalne i zwyczajowe stawiane w postępowaniach habilitacyjnych, w szczególności stawiane przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym. Całkowity dorobek naukowy, 20 publikacji z listy *JCR*, chociaż nieokazały, uważam za wystarczający do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Wysoko oceniam działalność dydaktyczną Habilitantki. Przedkładam Komisji do Spraw Postępowania Habilitacyjnego dr Agaty Głuszyńskiej powołanej przez Centralną Komisję do Spraw Stopni i Tytułów oraz Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Lech Celewicz

