

Toruń, 1.03.2023

dr hab. Marek Wiśniewski, prof. UMK

Katedra Chemii Materiałów Adsorpcji i Katalizy

Wydział Chemii

Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

mgr Patrycja Obara – recenzja – rozprawy doktorskiej

**„Badanie oddziaływania niekanonicznych form telomerowych  
fragmentów DNA z nanorurkami węglowymi  
przy zastosowaniu metod dynamiki molekularnej”**

przygotowanej pod opieką prof. dr hab. Tomasza Pańczyka, oraz dr Pawła Wolskiego, w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska obejmuje wszechstronnie przeprowadzone badania interakcji nanorurek węglowych z niekanonicznymi formami telomerowymi DNA. Ponieważ wyniki są bardzo cenne, nie mam wątpliwości, że dzieło to spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Obara do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Poniżej przedstawię uwagi dotyczące rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Obara jest 10-cio rozdziałową monografią, nie wliczając dość obszernej bibliografii.

Rozprawa jest jednolita tematycznie i porusza bardzo ważne zagadnienia z pogranicza chemii, chemii nanomateriałów, biotechnologii i medycyny pod wspólnym mianownikiem: wpływ nanostruktur węglowych na DNA. Stan wiedzy, choć rosnący, to ciągle jest fragmentaryczny i niewystarczający, stąd też wyniki uzyskane przez Autorkę uważam za bardzo cenne. Badania Autorki ściśle wpisują się w aktualne kierunki badawcze, o czym świadczy finansowanie uzyskane przez Narodowe Centrum Nauki.

Przedstawione w pracy wyniki badań teoretycznych, opierają się na symulacjach metodami dynamiki molekularnej oraz obliczeniach kwantowo-chemicznych, dużych układów złożonych z fragmentów DNA, zawierających jego niekanoniczne formy w postaci struktur I-motif i G-kwadrupleks oraz jednościennych nanorurek węglowych. Obliczenia MD zostały oparte na modelu all-atom i jawnej obecności rozpuszczalnika, co dodatkowo powiększa i komplikuje układ badawczy. W przeprowadzonych badaniach zastosowano klasyczne pole siłowe Amber, a do opisu nanorurek węglowych reaktywny potencjał AIREBO, który jest dość realistycznym polem siłowym dla materiałów węglowych.

Zastosowanie dobrze dobranych metod w badaniach *in-silico* pozwoliło Autorce zaobserwować zjawiska, które ze względu na niezwykłą złożoność są ciągle poza zasięgiem eksperymentalnym.

Oceniana rozprawa posiada układ typowy dla prac eksperymentalnych i spełnia wymogi stawiane takim opracowaniom. Napisana jest poprawnym językiem naukowym, którym Autorka dowodzi, że opanowała warsztat badawczy.

Treść została prawidłowo podzielona na rozdziały i podrozdziały; całość obejmuje 170 stron, z czego 23 strony stanowią spis cytowanej literatury. Monografia poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów.

**Pierwsze 3 rozdziały** właściwego tekstu stanowią: (i) opis niekanonicznych form DNA, obejmujący struktury dwu- trój- i czteroniciowe, w tym G-quadruplex i I-motif; (ii) opis oddziaływań niekanonicznych form DNA z ligandami stabilizującymi; oraz (iii) dość pobieżną charakterystykę nanorurek węglowych wraz z zastosowaniami.

Przyznam, że jest to rozdział do którego mam najwięcej uwag:

- odmianą alotropową, CNT albo są – albo nie; nie mogą być czasami uznawane
- S.41 L3 – jeżeli struktura ma być zwinięta to tylko cylindrycznie inaczej się nie da; ale, czy zwinięta warstwa grafenowa prowadzi do otrzymania cylindra?
- S41. L5 hybrydyzacja sp<sup>2</sup> tworzy struktury płaskie, tu mamy do czynienia z inną powierzchnią
- dwie grupy przy podziale CNT to trochę mało
- ich dość dobrą biokompatybilność – dyskusyjne
- S. 44 czytamy: „krótsze CNTs, ..... ze względu na swój rozmiar (często poniżej 1µm) łatwiej przenikają przez błonę komórkową.” Dlaczego długość (tak to rozumiem) wpływa na przenikalność przez błonę komórkową?
- S.45 czytamy: „Same nanorurki są nierozpuszczalne w wodnych roztworach...”: 2 pytania: (i) w jakich są rozpuszczalne? (ii) co to jest rozpuszczalność, gdyż 2 zdania dalej czytamy, że „funkcjonalizacja za pomocą różnych cząsteczek hydrofilowych i substancji chemicznych, poprawia rozpuszczalność w wodzie, biokompatybilność CNTs i także wpływają na zmniejszenie ich toksyczności”
- parę linijek niżej znajdujemy „fizjoadsorbpcję” oraz „cykloaddycję nitrenową” – proszę o wyjaśnienie
- trochę w opozycji stoi wniosek na S. 46 „właściwości toksyczne nanorurek są tym silniejsze im mniejsza ich agregacja”, która tym większa im większa funkcjonalizacja.

Pomimo niedociągnięć cały ten fragment, jest zwartą, logiczną i prawidłowo przygotowaną częścią pracy.

W kolejnym rozdziale Autorka przedstawia zastosowaną metodykę badań opisując zarówno stosowane pola siłowe jak i użyte potencjały.

Przyznam, że nie rozumiem dlaczego **Cele pracy** to dopiero piąty rozdział. Niemniej jednak cele rozprawy przedstawione są jasno i prawidłowo w czterech współzależnych punktach i konsekwentnie realizowane w dalszych rozdziałach monografii.

Dowiadujemy się tutaj m.in., że:

- stabilność G-quadrupleksu nie zależy od pH, co Autorka słusznie przypisuje modyfikacjom stanów energetycznych komplementarnego I-motifu. Przeciwnie, pH ma silny wpływ na stabilność I-motifu.

- zarówno nieprotonowany iM lub jego protonowany odpowiednik iMp adsorbują się na powierzchni nanorurek węglowych, a obecność grup funkcyjnych na CNT miała minimalny wpływ na lokalizację lub siłę adsorpcji.

- bezpośrednia reakcja przeniesienia protonu czy to z nanorurki z sfunkcjonalizowaną ścianą boczną, czy z nanorurki z sfunkcjonalizowaną końcówką jest bardzo mało prawdopodobna; pozornie łatwy dostęp grup karboksylowych do kieszeni cytozynowej, stwierdzony w badaniach Autorki, nie zapewnia bezpośredniego protonowania cytozyn; wg Autorki obecność wody jako nośnika protonów, wydaje się być konieczna.

Rozprawę doktorską kończy rozdział **Podsumowanie**, w którym umiejętność wyważonej oceny uzyskanych wyników umożliwia Autorce sformułowanie czterech rzeczowych i trafnych wniosków. Ostateczna konkluzja dysertacji jest taka, iż znajomość właściwości niekanonicznych form DNA oraz ich interakcji z nanomateriałami może przynieść korzyści nie tylko dla rozwoju dyscypliny badawczej dotyczącej badań fundamentalnych, projektowania, ale również do badań *in vitro* i *in vivo* układów nośników leków antynowotworowych.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki uważam:

- Wyznaczenie pracy niezbędnej do rozwinięcia niekanonicznych struktur DNA wraz z określeniem ich wzajemnego wpływu
- Określenie wpływu pH na proces rozwijania
- Analiza interakcji iM z nanorurkami węglowymi; określenie wpływu średnicy CNT na szybkość degradacji struktury iM
- Zbadanie możliwości bezpośredniego transferu protonów z grup funkcyjnych CNT do triad cytozyn, w obrębie telomerowego fragmentu DNA.

Niewdzięczną rolą recenzenta jest wyszukiwanie niedociągnięć. Lista niedociągnięć edytorskich, interpunkcyjnych czy fleksyjnych, choć mogłaby być długa, nie może przyćmić wartości recenzowanej pracy. Natomiast zagadnienia, które budzą pytania, jakie pojawiły się w trakcie lektury rozprawy (poza wymienionymi wyżej) skupione są wokół dwóch problemów:

- toksyczność nanomateriałów; czy wyniki przedstawione w monografii można uogólnić? Przenieść na inne struktury tj. grafen, fuleren, sadza czy też nanomateriały nieorganiczne?
- Jakie jest prawdopodobieństwo „dotarcia” CNT do jądra komórkowego, bez uszkodzenia całej komórki?

Przytoczone powyżej uwagi nie mają w żadnej mierze negatywnego charakteru i nie podważają wartości dysertacji i mojej, pozytywnej oceny.

Podsumowując, uważam, że cel pracy został osiągnięty, a postawione przez Doktorantkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr Patrycji Obara zawiera solidny, bogaty i wartościowy materiał badawczy, a Doktorantka ponadto wykazała się znajomością szerokiej gamy technik badawczych *in-silico*.

Rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim (w ustawie – prawo o szkolnictwie Wyższym i Nauce; Dz.U. z 2020 r poz 85 z późn. zm.), stawiam więc wniosek o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Obara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

