

Prof. dr hab. Bronisław Marciniak
Wydział Chemii
marcinia@amu.edu.pl

Poznań, dnia 30 listopada 2025

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Czai

pt. "Pochodne halogenowe 4-tiourydyny jako fotosensybilizatory uszkodzeń
DNA"

Rozprawa doktorska mgr Anny Czai pt. "Pochodne halogenowe 4-tiourydyny jako fotosensybilizatory uszkodzeń DNA" została wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka jako promotora doktoratu. Promotorem pomocniczym była dr Magdalena Zdrowowicz-Żamojć. Rozprawa dotyczy bardzo aktualnej tematyki, o dużym znaczeniu dla medycyny, a mianowicie poszukiwania nowych, efektywnych fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej komórek rakowych. Stanowi opracowanie naukowe o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym.

Praca doktorska została przedstawiona w formie tradycyjnej zawierającej wprowadzenie, cele pracy, metodologię, badania własne, podsumowanie oraz spis literatury. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bardzo przydatny dla czytelnika wykaz najczęściej stosowanych skrótów. Rozprawa została przedstawiona na 157 stronicach; zawiera 46 rysunków, 10 tabel oraz spis cytowanej literatury ze 163 pozycjami literaturowymi. Zakończona została, wchodzącym w skład pracy doktorskiej, artykułem opublikowanym ostatnio w Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.

Pierwszy rozdział rozprawy 1. *Wprowadzenie* został podzielony na kilka podrozdziałów stanowiących bardzo dobry wstęp do tematyki doktoratu. W podrozdziale 1.1 Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące terapii fotodynamicznej wraz z jej rysem historycznym, rozwojem i współczesnym zastosowaniem głównie w leczeniu onkologicznym. Przedstawiła stosowane fotosensybilizatory oraz cechy wymagane od idealnego fotosensybilizatora. Omówiła mechanizmy działania terapii fotodynamicznej wraz z ograniczeniami tej metody. Na zakończenie tego podrozdziału przedstawiła fotosensybilizatory wykorzystywane w leczeniu raka prostaty. Drugi podrozdział *Wprowadzenia* 1.2. obejmuje opis modyfikowanych nukleozydów oraz zasad azotowych jako fotosensybilizatory, ze szczególnym uwzględnieniem tiopochodnych nukleozydów i zasad azotowych takich jak: 4-tiotymidyna, 6-tioguanina, 4-tiouracyl, 4-tio-2'-deoksyurydyny oraz opis halogenowych pochodnych 2'-deoksyurydyny. Podrozdział ten zawiera także informacje literaturowe o fotochemicznych właściwościach halogeno-tionukleozydów, m.in. 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU) stosowanych w badaniach doktoratu. Po przedstawieniu fotosensybilizatorów w pierwszych dwóch podrozdziałach *Wprowadzenia* w podrozdziale 1.3 Doktorantka skoncentrowała się na materiale, który podlega działaniu fotosensybilizatorów, a mianowicie omówiła uszkodzenia natywnego i modyfikowanego DNA indukowane promieniowaniem ultrafioletowym.

Rozdział *Wprowadzenie* został napisany w sposób poprawny i przejrzysty w oparciu o odpowiednio dobrane pozycje literaturowych, w tym także prace dotyczące mechanizmu fotolizy halogenotiourydyn z grupy profesorów Skalskiego i Wenskiej z Wydziału Chemii UAM. Jest on wystarczającym wprowadzeniem do przedstawianych dalej problemów badawczych.

Cele rozprawy doktorskiej zostały przedstawione w rozdziale 2. Głównym celem pracy było zbadanie mechanizmu fotosensybilizującego działania halogeno pochodnych tiourydyny, a mianowicie 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU)

oraz 5-jodo-4-tio-2'deoksyurydyny (ISdU) w roztworach modyfikowanych nukleozydów, modelowych fragmentach DNA oraz w komórkach.

Szczegółowe cele badawcze dotyczyły trzech zasadniczych zagadnień:

- (1) Poznanie mechanizmu fotochemicznych reakcji nukleozydów BrSdU i ISdU
- (2) Zbadanie fotochemiczne indukowanych uszkodzeń modelowych fragmentów DNA znakowanych BrSdU
- (3) Analiza mechanizmu fotosensybilizującego działania BrSdU i ISdU w komórkach nowotworu prostaty.

Rozdział 3 rozprawy *Metodologia* składa się z trzech części omawiających ww. trzy zagadnienia. Pierwsza dotyczy fotolizy stacjonarnej modyfikowanych nukleozydów w roztworach, stosowanych odczynników, układów do naświetlań i procedur badawczych podczas naświetlania w skali analitycznej i preparatywnej, stosowanej aparatury do uzyskania i scharakteryzowania fotoproduktów, a także opisu metod obliczeniowych do uzyskania teoretycznych widm absorpcji fotoproduktów. Część druga przedstawia metody badawcze dla fotolizy oligonukleotydów znakowanych BrSdU: oczyszczanie oligonukleotydów, analiza instrumentalna, określenie stężenia oligonukleotydów, hybrydyzacja oligonukleotydów, procedury stosowane w fotolizie znakowanego DNA oraz do wyznaczenia wydajności kwantowej fotolizy na podstawie zaniku nici znakowanej, a także trawienia fotoproduktów. Część trzecia dotyczy metodologii w badaniach fotochemicznych prowadzonych w komórkach nowotworowych i zawiera opisy testu cytotoksyczności, układu do naświetlań i stosowanych procedur, testu klonogeniczności, cytometrycznego oznaczania cyklu komórkowego oraz śmierci komórkowej, cytometrycznej analizy fosforylacji histonu H2A.X, detekcji reaktywnych form tlenu oraz analizy statystycznej wyników. Rozdział *Metodologia*, podobnie jak poprzednie rozdziały rozprawy, oceniam pozytywnie. Doktorantka zastosowała poprawnie dobrane metody badawcze, co w konsekwencji doprowadziło do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych.

Najistotniejszą częścią rozprawy jest rozdział 3. *Badania własne*, w którym Doktoranta przedstawiła wyniki i dyskusję swoich badań. Podobnie jak przy prezentacji celów rozprawy i metodologii rozdział ten zawiera trzy podrozdziały dotyczące fotolizy stacjonarnej modyfikowanych nukleozydów BrSdU i ISdU, uszkodzeń modelowego DNA punktowo znakowanego BrSdU indukowanych promieniowaniem UVA oraz właściwości fotosensybilizujących BrSdU i ISdU na poziomie komórkowym.

Fotoliza stacjonarna BrSdU i ISdU została przeprowadzona w roztworach wodnych buforu fosforanowego w skali analitycznej i preparatywnej w celu identyfikacji fotoproduktów i uzyskania kinetyk ich tworzenia. Naświetlania prowadzano w układzie do naświetlań stosując promieniowaniem UVA ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$). Zastosowane metody analityczne (HPLC, spektrometria mas MS i MS/MS, spektroskopie UV-Vis, oraz ^1H NMR doprowadziły do identyfikacji 6 głównych fotoproduktów dla fotolizy BrSdU oraz 7 fotoproduktów dla ISdU, w tym dimerowych struktur disiarczkowych. Szczegółowe wyniki prowadzące do identyfikacji poszczególnych fotoproduktów zostały przedstawione w sposób jasny i poprawny. Struktury wielu produktów zostały jednoznacznie potwierdzone przez porównanie z wynikami analiz chromatograficznych i spektroskopowych dla posiadanych wzorców. Zidentyfikowane fotoprodukty wraz z ich strukturami zostały przedstawione w Tabeli 2, a kinetyki ich tworzenia i zaniku w trakcie naświetlania na Rysunku 11. Na podkreślenie zasługuje przeprowadzanie obliczeń teoretycznych (TD-DFT) widm absorpcji UV dla struktur fotoproduktów i porównanie widm teoretycznych z widmami uzyskanymi eksperymentalnie. Dobra zgodność widm teoretycznych i eksperymentalnych uzyskana dla większości fotoproduktów stanowi dodatkowy argument za prawidłową ich identyfikacją. Przedstawione na Rysunku 11 kinetyki tworzenia i zaniku poszczególnych fotoproduktów w trakcie naświetlania dało możliwość śledzenia mechanizmu wtórnych reakcji fotochemicznych zachodzący w badanym układzie. Obserwacje te Doktorantka trafnie zanalizowała poprzez niestabilność niektórych fotoproduktów (np. disiarczków **a6**, **b4** i **b5**) podczas

naświetlania, co wynika z absorpcji przez te fotoprodukty padającego promieniowania i ich wtórnej fotolizy. Na zakończenie tego podrozdziału Doktorantka w sposób opisowy przedstawiła propozycję mechanizmu reakcji zachodzących w badanym układzie z uwzględnieniem homolitycznego rozpadu wiązania C-X jako fotochemicznej reakcji pierwotnej.

Podsumowując podrozdział o fotolizie BrSdU i ISdU Doktorantka porównała uzyskane w doktoracie wyniki z wynikami badań grupy poznańskiej badającej podobne układy (pozycje 109 i 110). Wyniki fotolizy stacjonarnej i analizy fotoproduktów są porównywalne. Jednakże prezentowane w odnośniku 109 wyniki laserowej fotolizy błyskowej dały dodatkową możliwość bezpośredniej obserwacji krótko żyjących produktów, a mianowicie rodnika sulfanyłowego. Utworzony w reakcji homolitycznego rozpadu wiązania C-X rodnik urydylowy (5-C•) ulega przekształceniu w bardziej stabilny rodnik sulfanyłowy (RS•), uczestniczący w dalszych reakcjach, m.in. w tworzeniu disiarczków. Szkoda, że propozycja mechanizmu reakcji pierwotnych i wtórnych podczas fotolizy badanych pochodnych halogenowych 4-tiourydyny nie została przedstawiona przez Doktorantkę na całościowym schemacie, co znacznie ułatwiłoby jego zrozumienie i dyskusję.

Druga zasadnicza część rozprawy doktorskiej (drugi podrozdział w rozdziale *Badania własne*) dotyczy uszkodzeń modelowego DNA punktowo znakowanego BrSdU indukowanych promieniowaniem UVA. Na wstępie przedstawiono charakterystykę i sposób oczyszczania stosowanych nici komplementarnych oligonukleotydów znakowanych BrSdU oraz hybrydyzację prowadzącą do otrzymania dwuniciowych cząsteczek DNA o długości 30 par zasad. Następnie omówiono reaktywność fotochemiczną otrzymanych modeli dwuniciowych oligonukleotydów (trzy pary dwuniciowych oligonukleotydów o różnym otoczeniu podstawienia BrSdU). Jako metody analityczne zastosowano denaturującą wysokosprawną chromatografię cieczową (DHPLC) oraz chromatografię cieczowej sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS). Przeprowadzone badania wykazały powstawanie trwałych produktów

sieciowania nici DNA w wyniku fotolizy dupleksów zawierających BrSdU. Świadczy o tym powstawanie fotoproduktów o masach niewiele niższych od dwuniciowego DNA powstających poprzez dehalogenację BrSdU z wydzieleniem cząsteczki HBr lub eliminację innych fragmentów. Ważnym podkreślenia jest to, że dla żadnej pary zastosowanych dwuniciowych układów nie zaobserwowano fragmentów oligonukleotydów wskazujących na pęknięcia jednoniciowe.

Ilościowy opis efektywności obserwowanych reakcji fotochemicznych polegał na wyznaczeniu wydajności kwantowej zaniku nici znakowanej BrSdU (Tabela 7). Uzyskano bardzo małe wartości wydajności kwantowe rzędu 10^{-6} . (Uwaga dotycząca obliczenia wartości została przedstawiona w dalszej części recenzji). Zaobserwowano różnice w wartościach wydajności kwantowych w zależności od lokalnego otoczenia podstawienia BrSdU w nici DNA.

Naturalną konsekwencją dalszych badań było podjęcie próby identyfikacji trwałych fotoproduktów tworzonych podczas naświetlania dwuniciowych DNA znakowanego BrSdU. Doktoranta przeprowadziła te badania z zastosowaniem trawienia enzymatycznego i analizy LC-MS dla wybranej pary dwuniciowych oligonukleotydów o największej wydajności fotolizy. Zaproponowała strukturę fotoproduktu jako addukt (trimer) SdU-dA-dT (Rysunek 37) oraz mechanizm jego tworzenia w wyniku fotodehalogenacji BrSdU i addycji do atomu C8 adeniny (wewnątrznicowe sieciowanie), a następnie utworzenie wiązania z tyminą z nici komplementarnej (międzyniciowe sieciowanie).

Podsumowując badania prezentowane w tym podrozdziale, chciałbym podkreślić fakt wykazania dla modelowych dwuniciowych oligonukleotydów z punktową modyfikacją bromopochodną 4-tiourydyny (BrSdU) tworzenia stabilnych fotoadduktów zawierających wiązania kowalencyjne między zasadami azotowymi w przeciwieństwie do modyfikacji bromopochodną urydyny BrdU. W tym ostatnim przypadku, co wykazano w literaturze (m.in. pozycje literaturowe 125, 151), fotoreakcja zachodzi poprzez przeniesienie elektronu i pęknięcie nici DNA. Sugeruje to znaczny wpływ atomu siarki na właściwości fotochemiczne

badanych modeli DNA, a ściślej alternatywny mechanizm fotoreakcji związany z obecnością atomu siarki.

Trzecia zasadnicza część rozprawy doktorskiej (trzeci podrozdział w rozdziale *Badania własne*) obejmuje analizę mechanizmu fotosensybilizującego mechanizmu działania BrSdU i ISdU w komórkach nowotworu prostaty. Doktorantka wykazała, że stosowane fotosensybilizatory bez udziału promieniowania fotolizującego nie wykazywały cytotoksyczności. Jednakże naświetlanie układów prowadziło do znacznego spadku żywotności komórek, szczególnie dla ISdU, zależnie od zastosowanej dawki promieniowania. Testy klonogeniczności wykazały znaczne zmniejszenie przeżywalności komórek, jednakże efekt ten był silniejszy dla fotosensybilizatora ISdU w porównaniu do BrSdU. Przeprowadzone testy cytometryczne komórek naświetlanych promieniowaniem UVA w obecności fotosensybilizatorów BrSdU i ISdU dostarczyły dodatkowych informacji potwierdzających przydatność zastosowanych modyfikowanych nukleozydów jako fotosensybilizatorów. Jak pisze Doktorantka w *Podsumowaniu*: „dostarczyły informacji o zatrzymaniu cyklu komórkowego w fazie G2/M, indukowaniu wczesnej apoptozy, zwiększeniu poziomu γ H2A.X, czyli markera podwójnych pęknięć nici DNA oraz zwiększenia poziomu reaktywnych form tlenu”. Rozszerzenie zakresu doktoratu o badania działania BrSdU i ISdU jako fotosensybilizatorów względem komórek nowotworu prostaty znacznie uwiarygodniło możliwości ich zastosowania, a w konsekwencji wpłynęło na bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej

Podsumowując badania prezentowane w rozdziale *Badania własne*, jako fotochemik zajmujący się podobną tematyką badawczą, chciałbym podkreślić ogrom pracy eksperymentalnej Doktorantki włożonej w uzyskanie prezentowanych wyników. Wymagało to nie tylko wielkiego zaangażowania, ale przede wszystkim znajomości metod eksperymentalnych chromatograficznych, spektroskopowych, spektrometrii mas oraz metod obliczeniowych, a także metod badawczych stosowanych na poziomie komórkowym. Prezentowane w tym rozdziale wyniki i ich analizę oceniam bardzo pozytywnie.

Badania mgr Anny Czai zawarte w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele nowych i oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę dotyczącą pochodnych halogenowych 4-tiourydyny jako fotosensybilizatorów, a także ich potencjalnego zastosowania w fotodynamicznej terapii.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Zidentyfikowanie fotoproduktów tworzonych podczas fotolizy stacjonarnej wybranych halogeno-tionukleozydów: 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU) w buforowanych roztworach wodnych, w tym dimerowych struktur disiarczkowych oraz zaproponowanie mechanizmu reakcji fotochemicznych pierwotnych i wtórnych.
2. Wykazanie w przypadku fotolizy modelowych dwuniciowych oligonukleotydów z punktową modyfikacją BrSdU tworzenie stabilnych fotoproduktów sieciowania międzyniciowego o nieco niższej masie cząsteczkowej niż natywne duplekisy, zawierających kowalencyjne wiązanie między zasadami. Zaproponowanie dla wybranego układu struktury takiego fotoproduktu jako adduktu SdU-dA-dT. Fotoliza podobnych układów z modyfikacją BrdU (5-bromodeoksyurydyna) niezawierającą atomu siarki (II) prowadziła do jednoniciowych pęknięć.
3. Przeprowadzenie kompleksowych badań oceniających BrSdU i ISdU jako potencjalne fotosensybilizatory wobec komórek nowotworu prostaty. Wykazanie możliwości ich wykorzystania jako fotosensybilizatory w komórkach nowotworowych.

Na zakończenie z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić kilka komentarzy i uwag krytycznych.

Pierwsza dotyczy numeracji rozdziałów i podrozdziałów rozprawy. Bardzo klarowna numeracja w spisie rozdziałów przedstawionym na stronach 5-6 nie jest stosowana w dalszej części rozprawy. Dla przykładu na str.15 podrozdział

Terapia fotodynamiczna ma numer 8.1 zamiast 1.1. Wszystkie dalsze podrozdziały niezależnie od ich umiejscowienia w tekście mają numer 8 i kolejne numery podrozdziałów. Numer 8 w spisie rozdziałów dotyczy literatury.

Druga uwaga dotyczy wyznaczania wydajności kwantowej fotolizy na podstawie zaniku nici znakowanej (str. 47- 48 oraz str.114). Zgodnie z definicją wydajności kwantowej (wzór (4)) n_{foton} to liczba moli zaabsorbowanych fotonów przez układ. Czy w stosowanych warunkach eksperymentalnych całe padające promieniowanie dla $\lambda = 350 \text{ nm}$ było absorbowane? Jeśli nie, to wyniki prezentowane w Tabeli 7 wymagają korekty.

Trzeci komentarz dotyczy fotolizy BrSdU i ISdU w skali analitycznej (str. 54-61). Czy w opinii Doktorantki możliwe jest oszacowanie wydajności kwantowych zaniku substratu oraz tworzenia fotoproduktów korzystając z wyników prezentowanych na Rysunku 11, uwzględniając absorpcję promieniowania wzbudzającego przez fotoprodukty tworzone podczas naświetlania? Dodatkowa, czwarta, uwaga dotyczy różnych warunków prowadzenia eksperymentu dla fotolizy w skali analitycznej przedstawionych w rozdziale *Metodologia* (str. 43) oraz w rozdziale *Badania własne* (str. 54).

Piąta uwaga związana jest z nazewnictwem rodników typu RS•, w doktoracie (str. 67, 98) - rodniki tiolowe. Zgodnie z T. Sokołowska, A. Wiśniewski, *Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduów chemicznych*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 2001 str.40, Wiadomości Chemiczne, Biblioteka rodniki te powinny być nazywane jako sulfanylowe lub tiylowe.

Uwagi te oraz drobne pomyłki edytorskie zauważone w tekście nie wpływają na jakość rozprawy doktorskiej i moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej.

Mgr Anna Czaja jest młodym dobrze zapowiadającym się naukowcem o dużym jak na doktoranta doświadczeniu badawczym. Oprócz prezentowanej rozprawy doktorskiej i wchodzącej w jej skład jednej publikacji w *Spectrochimica*

Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, jest współautorem sześciu artykułów w renomowanych czasopismach naukowych: J. Am. Chem. Soc. (2 pozycje), International Journal of Molecular Sciences (2 pozycje), Scientific Reports, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry oraz jednego rozdziału w monografii naukowej. Jest także współautorem dwóch zgłoszeń patentowych. Uczestniczyła w realizacji projektów badawczych krajowych i uniwersyteckich. Prezentowała wyniki swoich badań na konferencjach naukowych międzynarodowych i krajowych. Jej rozwój naukowy oraz umiejętność pracy w zespole prowadzącym badania z wykorzystaniem różnorodnych metod i technik badawczych zasługują na bardzo pozytywną ocenę.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Czai odpowiada swoim poziomem naukowym i metodycznym wymaganiom ustawowym wynikającym z ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. 2024, poz.1571) i wymaganiom zwyczajowym stawianym pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie pracy i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Jurek' or similar, written in a cursive style.