



Prof. dr hab. inż. Elżbieta Jastrzębska
Wydział Chemiczny
Politechnika Warszawska
Ul. Noakowskiego 3
00-664 Warszawa

Warszawa, dn. 30 grudnia 2025 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Czai

pt. „**Pochodne halogenowe 4-tiourydyny jako fotosensybilizatory uszkodzeń**

DNA” wykonanej w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych

Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Promotor: prof. dr hab. Janusz Rak

Promotor Pomocniczy: dr Magdalena Zdrowowicz-Żamojć

Podstawę wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne, pana prof. dr hab. Zbigniewa Kaczyńskiego (z dnia 16.10.2025 r.), zgodnie z Uchwałą Rady podjętą w dniu 15.10.2025 roku.

Przedłożona do recenzji praca doktorska ma charakter monotematyczny i dotyczy badania analogów urydyny: 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydynie (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydynie (ISdU), jako potencjalnych związków mogących znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej (PDT). Terapia fotodynamiczna jest alternatywą lub uzupełniającą do chemio- i radioterapii metodą leczenia nowotworów, wymagającą trzech elementów: fotouczulacza/ fotosensybilizatora (PS) - związku chemicznego selektywnie akumulującego się w komórkach nowotworowych, światła o określonej długości fali oraz tlenu rozpuszczonego w komórkach. Największe wyzwanie stanowi opracowanie skutecznych fotouczulaczy, selektywnie akumulujących się w komórkach nowotworowych, dodatkowo aktywnych w warunkach niskiego stężenia tlenu. Pomimo tego, że

badania nad wykorzystaniem terapii fotodynamicznej w leczeniu nowotworów prowadzone są od wielu lat, tematyka badań jest ciągle aktualna, a poszukiwanie nowych, selektywnych fotouczulaczy jest jednym z kluczowych zagadnień PDT. **Tematyka podjętych badań jest więc ważna i bez wątpienia wpisuje się w rozwój zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny nauki chemiczne.**

Biorąc powyższe pod uwagę, Doktorantka w swej pracy podjęła się zbadania mechanizmu fotosensybilizującego modyfikowanych nukleozydów (MN) 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU). Zainteresowanie wykorzystaniem tych związków wynikało z ich unikatowych właściwości fotochemicznych, co jest możliwe dzięki obecności atomu siarki i halogenu. Pozwala to wzbudzanie tych związków światłem UVA, co zapewniać ma większą penetrację tkanek i mniejszą cytotoksyczność względem komórek prawidłowych niż światło UVB/UVC.

Jako cele szczegółowe Doktorantka określiła:

1. Zbadanie fotochemicznych właściwości BrSdU oraz ISdU.
2. Zbadanie fotochemicznie indukowanych uszkodzeń modelowych fragmentów DNA znakowanych BrSdU.
3. Analizę właściwości fotobiologicznych BrSdU oraz ISdU z wykorzystaniem hodowli komórek nowotworu prostaty.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma układ klasyczny, składa się z dziesięciu rozdziałów z czego pięć pierwszych stanowi główną część pracy. W skład tej części wchodzi: Wprowadzenie, Cel pracy zdefiniowany na podstawie przeprowadzonej analizy literatury, Metodologia, Badania własne oraz Podsumowanie. Pozostałe rozdziały (37 stron) to: Wykaz rysunków, Wykaz tabel, Literatura, Publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej oraz Dorobek Naukowy. Całość pracy liczy 180 stron. Praca została napisana w języku polskim i ubogacona wykresami, schematami, widmami, a także tabelami. Od strony edytorskiej oceniam pracę bardzo dobrze. Popelniono pewne błędy edytorskie, skróty myślowe, część z nich wskazuję w dalszej części recenzji, jednak nie umniejszają one wysokiej oceny niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pierwszą część pracy stanowi Wprowadzenie (27 stron) będące przeglądem aktualnego stanu wiedzy w tematyce rozprawy doktorskiej. Doktorantka opisuje czym charakteryzuje się terapia fotodynamiczna oraz wskazuje rys historyczny rozwoju tej terapii w leczeniu różnych schorzeń, w tym nowotworów. Warte zauważania jest to, że Doktorantka przedstawia również

aktualne zastosowanie tej terapii w badaniach klinicznych (str. 18-19), co podkreśla istotę poszukiwania nowych, bardziej skutecznych PS. Stąd trochę niefortunne było wskazanie pozycji literaturowych opartych o badania *in vitro* w stwierdzeniu „*Terapia fotodynamiczna jest obecnie stosowana jako alternatywa wielu chorób nowotworowych.*” (str. 17). W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przybliżyła typy PS dotychczas wykorzystywane w terapii fotodynamicznej, cechy idealnego fotouczulacza, mechanizm działania PDT oraz jej ograniczenia. W kolejnym rozdziale Doktorantka charakteryzuje modyfikowane nukleozydy (MN) oraz zasady azotowe tj. tiopochodne nukleozydów i zasad azotowych; halogenowane pochodne 2'-deoksyurydyny oraz halogeno-tionukleozydy jako potencjalne fotouczulacze, wykorzystywane w PDT, co istotnie dyskutując ich aktualne wykorzystanie w badaniach komórkowych *in vitro*. Ostatni rozdział stanowi opis wpływu promieniowania ultrafioletowego na mechanizmy uszkodzenia natywnego i modyfikowanego DNA. **W mojej ocenie przegląd literatury w pełni pokrywa tematykę będącą podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej. Dobór literatury oraz sposób jej przedstawienia oraz dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki oraz posiadaniu ogólnej wiedzy teoretycznej dla osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.** Poza pewnymi niedociągnięciami stylistyczno-edytorskimi (np. brak wyjaśnienia skrótów przy pierwszym ich zastosowaniu w tekście, braku zastosowaniu skrótu „ang.” przed wyjaśnieniem nazw w języku angielskim) w tej części rozprawy zabrakło mi jednak krótkiego syntetycznego podsumowania stanu wiedzy, z którego wynikałaby zasadność badania związków będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej. Chociaż warto zauważyć, że w ostatnim akapicie na str. 40 („*W literaturze nie odnotowano doniesień powstawania ICL w oligonukleotydach znakowanych BrSdU lub ISdU....*”) pewne wskazania zostały przez Doktorantkę poczynione, więc szkoda że nie zostały bardziej rozwinięte w podsumowaniu.

W kolejnym rozdziale Doktorantka definiuje cel główny oraz cele szczegółowe pracy (nadmienione wcześniej w niniejszej recenzji). Zaskakująco doktorantka, w tej części krótko podsumowała wyniki kolejnych etapów prac. W mojej ocenie cenniejsze byłoby wskazanie hipotezy badawczej pracy, ponieważ zabrakło jej jasnego zdefiniowania w całej rozprawie doktorskiej.

W kolejnej części dysertacji zatytułowanej Metodologia (9 stron) Doktorantka opisała metody badawcze, które wykorzystwała w badaniach: fotolizy stacjonarnej modyfikowanych nukleozydów, fotolizy oligonukleotydów znakowanych BrSdU oraz komórkowych z wykorzystaniem badanych związków. Mimo, że wszystkie materiały i odczynniki wraz ze

stosowaną aparaturą badawczą zawarte są w treści metodologii, brakuje ich spisu. Zdecydowanie ułatwiłoby identyfikację poszczególnych pozycji oraz źródło ich pochodzenia. Rozdział Metodologia **wskazuje interdyscyplinarność prowadzonych badań oraz konieczność znajomości przez Doktorantkę wielu technik i metod badawczych.** Doktorantka wykorzystała szereg technik związanych z syntezą, oczyszczaniem, charakterystyką po naświetlaniu związków BrSdU i ISdU oraz badaniem ich właściwości biologicznych, a także oczyszczaniem oraz charakterystyką oligonukleotydów znakowanych BrSdU. W analizie wykorzystywała m.in. takie metody jak: HPLC, LC-MS, MS/MS, UV i ¹HNMR oraz metody obliczeniowe. W tej części metodyka została bardzo szczegółowo opisana i nie budzi żadnych wątpliwości ani pytań. Na podkreślenie zasługuje precyzyjne podanie m.in. parametrów naświetlania światłem UVA, co bardzo często nie jest jednoznacznie wskazywane w literaturze naukowej. Zabrakło mi jedynie informacji czy warunki naświetlania roztworów były przeprowadzane w warunkach beztlenowych. Do analizy właściwości biologicznych Doktorantka wykorzystywała szereg metod związanych z hodowlą i charakterystyką komórek nowotworu prostaty, tj. analiza cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTT, test klonogeniczności, cytometria przepływowa. W tej części Doktorantka nie uniknęła pewnych niedociągnięć oraz niejasności, które wymagają wyjaśnienia. Zabrakło kilku informacji związanych m.in. z prowadzeniem hodowli komórkowych tj. nr katalogowy linii komórkowej PC3, procentowa zawartość suplementów pożywki hodowlanej (tj. FBS, antybiotyki), sposób pasażowania komórek i uzyskiwania zawiesiny komórkowej. Doktorantka nie uniknęła nieodpowiednio zastosowanych sformułowań czy skrótów myślowych, np. „*ilość komórek*” (str. 49), „*komórki posiane w ilości*”, „*pełny obraz kondycji komórek*”, „*wszystkie manipulacje*” (str. 51). Pojawia się kilka pytań związanych z metodyką prowadzenia badań. Doktorantka wskazuje, że „*Komórki nowotworu prostaty PC3 (zakupione z banku ATCC) hodowano w pożywce F12k suplementowanej 10% roztworem PBS oraz antybiotykami...*” – czy nie chodzi o FBS zamiast PBS? W opisie testu MTT, Doktorantka pisze, że do komórek dodano roztwór soli MTT o stężeniu 4 mg/ml. Zazwyczaj jako stężenie końcowe stosuje się stężenie ~ 0,4 mg/ml. Proszę o komentarz. Nie jest jasne w czym przygotowywane były końcowe roztwory BrSdU oraz ISdU? W testach biologicznych zazwyczaj jako kontrolę negatywną stosuje się medium hodowlane. Doktorantka wskazała, że zastosowała wodę jako kontrolę. Jeśli tak, proszę o komentarz czy i w jaki sposób zastosowanie takiej kontroli wpływać mogło na stan hodowli komórkowej. Mimo powyższych uwag, w oparciu o przedstawioną metodykę badawczą oraz wyniki prowadzonych badań stwierdzam, że **Doktorantka jest**

zaznajomiona z różnymi technikami badawczymi oraz ma umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej z zakresu nauk nie tylko chemicznych ale również biologicznych. Warto podkreślić również, że o dojrzałości naukowej Doktorantki świadczą podejmowane współprace m.in. w zakresie prowadzenia obliczeń teoretycznych widm absorpcji fotoproduktów (z dr Samantą Makurat z Uniwersytetu Gdańskiego) oraz otrzymania oligonuklotydów (z prof. Ryszardem Kierzkim z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu), co jest niezmiernie istotne w przypadku prowadzenia badań interdyscyplinarnych.

Badania własne (86 stron) poświęcone analizie właściwości fotochemicznych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU) stanowiły główną część dysertacji i obejmowały: 1) fotolizę stacjonarną modyfikowanych nukleozydów, pozwalającą na scharakteryzowanie reakcji fotochemicznych jakim ulegają badane nukleozydy w roztworze wodnym, 2) fotolizę dwuniciowych oligonukleotydów punktowo znakowanych BrSdU, 3) analizę właściwości fotosensybilizujących modyfikowanych nukleozydów w hodowli komórek nowotworu prostaty.

W toku badań Doktorantka wykazała wysoką fotoreaktywność BrSdU oraz ISdU, po wzbudzeniu światłem UVA, co doprowadziło do powstania szeregu produktów reakcji fotochemicznych. Doktorantka zidentyfikowała, że głównymi, wspólnymi produktami fotolizy dla BrSdU i ISdU są 2'-deoksyurydyna, 4-tio-2'-deoksyurydyna. Generowanie 2'-deoksyurydyny zachodziło efektywniej dla BrSdU niż ISdU wraz ze wzrostem dawki naświetlania. Dodatkowo, zidentyfikowała takie produkty fotolizy jak, dla BrSdU: 5-bromo-2'-deoksyurydyna, dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-hydroksy)-dideoksyurydynowy, dimer 4,5'-tio-(5-bromo-4'-tio)-dideoksyurydynowy i disulfid 5,5'-dibromo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny, natomiast dla ISdU: 5-jodo-2'-deoksyurydyna, disulfid 4,4'-ditio-dideoksyurydyny, disulfid 5,5'-dijodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny oraz disulfid 5-jodo-4,4'-ditio-dideoksyurydyny. Otrzymane produkty fotolizy różniły się stabilnością, wykazano że część z nich ulegała wtórnym reakcjom po naświetleniu wyższymi dawkami UVA.

W kolejnym etapie, Doktorantka badała fotochemiczne właściwości oligonuklotydów punktowo znakowanych BrSdU. Analizowała trzy różne sekwencje ssDNA, różniące się podatnością na dalekozasięgowy transfer elektronu (ET). W toku badań wykazała nietypowy przebieg reakcji fotochemicznej, BrSdU nie inicjowała pęknięć nici DNA poprzez mechanizm dalekozasięgowego transferu elektronu. Zamiast tego zaobserwowano tworzenie stabilnych

fotoadduktów zawierających kowalencyjne wiązania między zasadami azotowymi, co sugeruje alternatywny mechanizm działania związany z obecnością atomu siarki w cząsteczce MN. Na podstawie uzyskanych danych eksperymentalnych Doktorantka wnioskuje obecność sieciowania międzyniciowego. Należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się zaproponowania struktury fotoproduktu powstającego w wyniku fotolizy DNA znakowanego BrSdU. **Bez wątplenia uzyskane wyniki stanowią nową i istotną wiedzę w zakresie fotochemii pochodnych halogenowanych 4-tiourydyny. Z biologicznego punktu widzenia, może mieć to istotne znaczenie w ich potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów.** Doktorantka zdecydowała się na przeprowadzenie analiz z wykorzystaniem jednego z badanych związków. Bardzo proszę o komentarz czemu, akurat ten związek zastosowano?

Właściwości fotouczulające BrSdU i ISdU Doktorantka potwierdziła również w badaniach biologicznych *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli komórek nowotworu prostaty. Udowodniła, brak cytotoksyczności badanych związków w szerokim zakresie badanych stężeń. Ponadto, wykazała ich wysoką fotocytotoksyczność (związek + światło UVA), wzrastającą wraz z dawką promieniowania UVA. Doktorantka podjęła się również zaproponowania mechanizmu działania badanych nukleozydów po naświetleniu światłem UVA. Potwierdziła zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, indukowanie wczesnej apoptozy, zwiększenie markera podwójnych pęknięć nici DNA oraz zwiększeniu poziomu reaktywnych form tlenu. Obserwowane to było głównie dla wyższych dawek PS. **Uzupełnienie badań fotolizy o badania komórkowe dostarczyły istotnej wiedzy dotyczącej właściwości fotobiologicznych badanych analogów i możliwości zastosowania ich w terapii przeciwnowotworowej.** Warto zauważyć, że Doktorantka, w każdym z powyższych rozdziałów krótko wprowadza w problematykę badawczą, opisując zagadnienie jakie będzie podejmowała w danym podrozdziale wraz z krótkim opisem przeprowadzonych badań. Dodatkowo, każdy z podrozdziałów zawiera Dyskusję wyników, obejmującą podsumowanie wyników oraz dyskusję otrzymanych wyników również w oparciu o aktualny stan wiedzy. Ułatwia to zrozumienie prezentowanych wyników badań oraz **świadczy o przeprowadzeniu dogłębnej analizy uzyskanych wyników przez Doktorantkę.**

Przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej wyniki badań stanowią oryginalne badania oraz wnoszą istotną wiedzę, potwierdzającą właściwościach fotochemiczne i fotobiologiczne BrSdU i ISdU, co czyni je atrakcyjnymi w kontekście zastosowania w terapii fotodynamicznej. Nie ulega wątpliwości, że Doktorantka osiągnął założony cel pracy. Na szczególną uwagę zasługuje interdyscyplinarność prowadzonych badań. Doktorantka

musiała zapoznać się różne techniki z pogranicza różnych dziedzin nauki. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, w tym pogłębionych analiz mechanizmów reakcji fotochemicznych w warunkach biologicznych oraz porównań z działaniem klasycznych fotouczulaczy. Ciekawym byłoby przeprowadzenie analogicznych badań np. w warunkach hipoksji, wobec komórek prawidłowych czy z wykorzystaniem złożonych modeli komórkowych jakim są sferoidy, naturalnie wytwarzające rdzeń nekrotyczny. W dalszej perspektywie, opracowanie tego typu fotouczulaczy może przyczynić się do opracowania bardziej selektywnych i efektywnych metod leczenia nowotworów z wykorzystaniem PDT.

Aktywność naukowa Pani mgr Anny Czai zasługuje na podkreślenie. Doktorantka jest współautorką 1 pracy wchodzącej w skład pracy doktorskiej oraz 7 innych prac nie wchodzących w skład rozprawy, ale pośrednio związanych z tematyką doktoratu, 2 zgłoszeń patentowych. Brała udział w 11 konferencjach międzynarodowych i krajowych (w tym 3 referaty ustne). Jest laureatką 3 nagród skierowanych dla młodych naukowców.

Poniżej podaję kilka aspektów, które mogą być podstawą do dyskusji w trakcie obrony rozprawy doktorskiej:

- Bardzo proszę o wskazanie hipotezy badawczej pracy oraz odniesienie się czy została ona potwierdzona w toku badań.
- Doktorantka kilkakrotnie wspomina w dysertacji, że jest „*ciągłe zainteresowanie fotosensybilizatorami, które mogą działać w warunkach hipoksji*” i w badaniach między innymi dlatego wykorzystuje BrSdU oraz ISdU. Na jakiej podstawie jest wyciągnięty powyższy wniosek, że związki te takie właściwości posiadają?
- W podsumowaniu Doktorantka sugeruje, że pierwszym etapem badań była „*fotoliza stacjonarna modyfikowanych nukleozydów, pozwalająca na scharakteryzowanie reakcji fotochemicznych jakim ulegają badane nukleozydy w roztworze wodnym w warunkach beztlenowych.*” Czy rzeczywiście Doktorantka prowadziła badania w warunkach beztlenowych, jeśli tak to jak te warunki zapewniono?
- Doktorantka badała fotochemiczne właściwości oligonuklotydów punktowo znakowanych BrSdU. Czemu w badaniach zostało zastosowane BrSdU, a nie ISdU? Jakich wyników należałoby się spodziewać dla ISdU?
- Bardzo proszę o komentarz, dlaczego w badaniach zastosowano komórki nowotworu prostaty? Dodatkowo, hodowlę prowadzono w warunkach 37C 5% CO₂. Czy

Doktorantka podejmowała próbę prowadzenia hodowli tych komórek w warunkach hipoksji? Jak takie warunki można uzyskać w hodowli komórkowej?

- Bardzo proszę o krótki komentarz dotyczący wcześniej wymienionej metodologii i hodowli i badań komórkowych: skład pożywki hodowlanej, stężenie MTT, w czym przygotowywane były końcowe roztwory BrSdU oraz ISdU, co stanowiło kontrolę w badaniach biologicznych?
- W badaniach fotocytotoksyczności zastosowano stężenia BrSdU i ISdU 50 oraz 100 μM . Proszę wyjaśnić na jakiej podstawie te stężenia zostały wybrane do dalszych badań.

Przykładowe, inne uwagi:

- W wielu miejscach brakuje wyjaśnienia skrótu przy jego pierwszym zastosowaniu.
- W przypadku podawania nazw angielskojęzycznych, należy zastosować skrót „ang.”. Brakowało go w kilku miejscach w tekście (np. str. 32, 39, 44). Skrótu nie piszemy kursywą. Zastosowano kursywę w wykazie skrótów.
- Rys. 26. Dotyczy ISdU (teoretyczne widmo) – niewidoczna jest jednostka na OY. Rys. 31 – brak jednostek.
- Wcześniej wspomniane potknięcia językowe i stylistyczne.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Czai **stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571)**. Zgodnie z zapisem Ustawy Art. 187. Pkt 1. "Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej" oraz pkt. 2. "Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne." W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej rozprawy doktorskiej wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego **o dopuszczenie mgr Anny Czai do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Na podkreślenie zasługuje bardzo dobre opanowanie i wykorzystanie przez Doktorantkę szerokiego zakresu metod badawczych, a także opanowanie umiejętności opracowania i

prezentacji wyników oraz znajomość najnowszych prac i danych literatury światowej dotyczących problematyki podjętej w pracy doktorskiej. W przeprowadzonych badaniach doktorantka potwierdziła właściwości fotochemiczne i fotobiologiczne BrSdU i ISdU. Przede wszystkim wykazała wysoką fotoreaktywność badanych związków, po wzbudzeniu światłem UVA i z powodzeniem zidentyfikowała szeregu produktów reakcji fotochemicznych. Ponadto, w badaniach fotolizy DNA znakowanego BrSdU, zaobserwowała inny mechanizm działania do klasycznych halogenowych nukleozydów, co bez wątpienia stanowi nową i istotną wiedzę w zakresie wykorzystania tych związków w terapii nowotworów. Biorąc pod uwagę powyższe, wartościowy naukowo i wysoki poziom merytoryczny badań, **pragnę rekomendować niniejszą rozprawę do wyróżnienia.**

Recenzent

