

Kraków, 05.11.2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Czai

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Czai pt. „*Pochodne halogenowe 4-tiourydyny jako fotosensybilizatory uszkodzeń DNA*” została przygotowana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka, przy współudziale dr Magdaleny Zdrowowicz-Żamojć jako promotor pomocniczej.

Tematyka podjęta w pracy dotyczy jednego z aktualnych kierunków współczesnej chemii medycznej, fotochemii i fotomedycyny czyli poszukiwania nowych fotosensybilizatorów, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii fotodynamicznej (PDT) nowotworów. W obliczu ograniczeń klasycznych schematów terapeutycznych, w tym rosnącej oporności komórek nowotworowych na chemioterapię czy radioterapię, rozwój alternatywnych, nieinwazyjnych strategii precyzyjnie ukierunkowanych i kontrolowanych światłem, nabiera coraz większego znaczenia. Praca Pani Anny Czai doskonale wpisuje się w ten nurt badań, łącząc w sposób interdyscyplinarny metody chemii teoretycznej, fotochemii oraz biologii molekularnej. Doktorantka przeprowadziła kompleksową analizę właściwości fotochemicznych i fotobiologicznych 5-bromo-4-tio-2'-deoksyurydyny (BrSdU) oraz 5-jodo-4-tio-2'-deoksyurydyny (ISdU), czyli związków, które dzięki swojej strukturze (obecności atomów siarki i halogenu) wykazują odmienną reaktywność fotochemiczną w porównaniu z klasycznymi analogami urydyny.

Zakres badań obejmował trzy logicznie obszary: i) analizę mechanizmów fotochemicznych z wykorzystaniem technik HPLC, LC-MS/MS i NMR; ii) badania DNA zawierającego punktowe modyfikacje halogenowych tiourydyn; iii) testy biologiczne przeprowadzone na liniach komórkowych raka prostaty (PC3), w tym ocenę cytotoksyczności i klonogenności, analizę cyklu komórkowego, apoptozy, poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz markerów uszkodzeń DNA (γ H2A.X). Zgromadzony materiał eksperymentalny świadczy o imponującym warsztacie badawczym i dojrzałości naukowej Autorki, a dobór stosowanych metod jest adekwatny do postawionych celów. Szczególnie cenne jest powiązanie mechanizmów fotochemicznych z wynikami uzyskanymi w układach komórkowych. Takie podejście, rzadko spotykane na poziomie doktoratu, pozwala na pełniejsze zrozumienie natury fotoindukowanych uszkodzeń DNA i ich konsekwencji biologicznych.

Już na wstępie należy podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa wyróżnia się wysokim poziomem merytorycznym, spójnością koncepcji badawczej i interdyscyplinarnością. Została

przygotowana zgodnie z wymogami określonymi w art. 187 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i składa się z części wprowadzającej obejmującej streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literaturowy oraz cele badawcze, a także z rozdziału zawierającego szczegółowe omówienie wyników własnych oraz wniosków końcowych. Integralnym elementem dysertacji jest publikacja opublikowana w *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (2025), co potwierdza uznanie i wiarygodność uzyskanych wyników w międzynarodowym środowisku naukowym. Rozprawa została napisana z właściwą starannością edytorską, z przejrzystą strukturą i bogatą oprawą graficzną obejmującą schematy reakcji, widma oraz wykresy. Układ pracy jest czytelny i w pełni zgodny z zasadami obowiązującymi dla prac doktorskich z zakresu nauk chemicznych. Podkreślić należy także ponadprzeciętny dorobek naukowy Doktorantki, obejmujący współautorstwo publikacji w renomowanych czasopismach naukowych t. j. *JACS*, *J. Med. Chem.*, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* (7 publikacji oryginalnych o imponującym łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 46,2$ oraz 1 rozdział w książce wyd. Springer Nature), współautorstwo 2 zgłoszeń patentowych, udział w projektach badawczych (5 projektów) i konferencjach naukowych (3 referaty ustne i 8 posterów), co świadczy o jej wyróżniającej aktywności naukowej. Już ten ogólny przegląd pozwala stwierdzić, że rozprawa Pani Anny Czai jest interdyscyplinarną i wartościową pracą doktorską.

Część pierwsza rozprawy jest przygotowana starannie i stanowi klarowne wprowadzenie w problematykę badań. Autorka dobrze prowadzi czytelnika od ogólnego tła naukowego do motywacji aplikacyjnych, a następnie do celów pracy. Mocną stroną jest spójne splecenie przeglądu literatury z uzasadnieniem przyjętej strategii badawczej. Widać tu bardzo dobrą orientację w literaturze, zarówno klasycznej, jak i w najnowszych doniesieniach poświęconych tiopochodnym nukleozydów i fotochemii z zakresu UVA w kontekście uszkodzeń DNA, co wzmacnia wiarygodność wprowadzonych hipotez i celów badawczych. Na plus oceniam także to, że we wstępie pojawiają się informacje łączące kontekst kliniczny z doбором narzędzi fotochemicznych (rola absorpcji w zakresie NIR w celu głębszej penetracji tkanek, wybór modeli nowotworów), a część poświęcona guzom prostaty płynnie motywuje wątki dotyczące terapii fotodynamicznej. Przywołane przykłady padeliporfin (Tookad Soluble) czy redaporfin w PDT i omówienie wyników klinicznych wzmacniają medyczną aktualność wstępu. Jakkolwiek część wprowadzająca jest solidna i spójna, w tekście dostrzegalne są pewne niekonsekwencje terminologiczne i drobne nieścisłości merytoryczne, które mogą zaburzyć klarowność przekazu. W kilku miejscach Autorka używa zamiennie określeń „fotosensybilizator”, „fotouczulacz”, „lek fotouczulający” czy „związek uwrażliwiający komórki na promieniowanie”. W kontekście PDT właściwe i zgodne z nomenklaturą fotochemiczną jest

konsekwentne stosowanie terminu fotosensybilizator; „lek fotouczulający” ma szersze znaczenie (np. ketoprofen) i nie musi oznaczać PS wykorzystywanego w terapii fotodynamicznej. Podobna uwaga dotyczy stosowanej terminologii: równoległe używanie skrótów RFT i ROS wprowadza niepotrzebne zamieszanie i obniża czytelność tekstu. Z uwagi na międzynarodowy charakter badań właściwe byłoby konsekwentne stosowanie skrótu ROS (reactive oxygen species), tak jak powszechnie używa się PDT (photodynamic therapy), zamiast jego polskiego odpowiednika TFD. Miejscami pojawia się też niestandardowy zapis rodników tlenowych; poprawnie jest np. $\cdot\text{OH}$ (symbol rodnika przy atomie tlenu a nie wodoru). Są to kwestie formalne, ale w naukach interdyscyplinarnych porządek terminologiczny realnie ułatwia odbiór. W części pracy dotyczącej dermatologii słusznie przywołano kwas 5-aminolewulinowy (Rys. 3), jednak należy pamiętać, że 5-ALA nie jest fotosensybilizatorem, a jedynie swoistym ‘prolekiem’, który *in situ* prowadzi do powstania protoporfiryny IX (PpIX). To właśnie PpIX pełni rolę właściwego fotosensybilizatora, który po absorpcji światła przechodzi poprzez spinowo wzbronione przejście międzysystemowe do długożyjącego stanu trypletowego stanowiącego prekursor ROS. Autorka w innych miejscach to rozróżnienie stosuje, co doceniam; warto jedynie pamiętać o zachowaniu pełnej konsekwencji narracyjnej. Z kolei omawiając terapię ukierunkowaną na naczynia nowotworowe (V-PDT/VTP), przywołano padeliporfin w powiązaniu z WST09/Tookad, co zaciera istotne rozróżnienie. Tookad (WST09), o nazwie INN padaporfin, jest wcześniejszą, hydrofobową palladową pochodną bakteriofeoforbidu, natomiast Tookad Soluble (padeliporfin, WST11) to pochodna rozpuszczalna w wodzie, która zastąpiła formułę z Cremophorem na etapie badań klinicznych. Warto również dopowiedzieć, co wynika z przytoczonych danych klinicznych, że w PDT raka prostaty celowanie w naczynia nowotworowe jest co najmniej równie uzasadnione, jak dążenie do akumulacji fotosensybilizatora w samych komórkach nowotworowych. W części literaturowej pojawia się kolejny fotosensybilizator z grupy bakteriochloryn (dobrze mi znany redaporfin), przy czym głównym odniesieniem jest rozprawa doktorska Luisa B. Rochy. Dla pełniejszego osadzenia tematu zabrakło jednak kilku prac źródłowych dokumentujących metodę syntezy i właściwości tego fotosensybilizatora oraz znaczenie doboru formuły dla skuteczności PDT w warunkach hipoksji. W tym miejscu naturalne byłoby zwięzłe odwołanie do kluczowych publikacji: *Chem. Eur. J.* 2014, *ChemMedChem* 2014, *Eur. J. Cancer* 2015, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, *Sci. Rep.* 2019.

Cele badawcze rozprawy zostały sformułowane jasno, logicznie i w pełni odpowiadają problematyce przedstawionej we wstępie. Autorka prawidłowo wyprowadza je z wcześniejszego przeglądu literatury, a ich układ wskazuje na przemyślaną strategię eksperymentalną: od badań fotochemicznych

pojedynczych nukleozydów, przez modele DNA, aż po testy biologiczne. Taki sposób budowania hipotezy badawczej i planu doświadczeń świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w interdyscyplinarnej naturze tematu i o umiejętności łączenia perspektywy chemicznej z biologiczną. Celem nadrzędnym było zrozumienie mechanizmów fotoreaktywności 5-halogenowych pochodnych 4-tio-2'-deoksyurydyny oraz ocena ich potencjału jako fotosensybilizatorów, ze szczególnym uwzględnieniem relacji między strukturą chemiczną, reaktywnością fotochemiczną i skutkami biologicznymi. Cel ten został zrealizowany konsekwentnie, a każdy z etapów badań wnosi istotną wartość poznawczą.

Struktura pracy jest przejrzysta i zgodna z klasycznym układem rozpraw doktorskich w dziedzinie nauk chemicznych. Część eksperymentalna obejmuje logicznie ułożone segmenty: badania fotochemiczne, i fotofizyczne i obliczenia teoretyczne, następnie analizę zachowania modyfikowanych nukleozydów w strukturze DNA oraz testy biologiczne. Takie uporządkowanie pozwala na płynne przejście od modeli molekularnych do złożonych układów biologicznych i dobrze oddaje interdyscyplinarny charakter badań. Wnioski są zwarte, rzeczowe i adekwatne do przedstawionych wyników. Na uwagę zasługuje umiejętne połączenie metod fotochemicznych i biologicznych. Zastosowanie HPLC–MS/MS, NMR i obliczeń TD-DFT umożliwiło precyzyjną identyfikację produktów fotolizy, a część biologiczna, obejmująca m.in. testy cytotoksyczności, klonogenności i analizę cyklu komórkowego, potwierdza dojrzałość warsztatu badawczego Doktorantki. Dane zaprezentowano w sposób klarowny i poprawny statystycznie, a estetyka rycin i konsekwencja w oznaczeniach świadczą o dużej dbałości o szczegóły.

Część fotochemiczna została opracowana z dużą starannością i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu eksperymentalnym Doktorantki. Autorka łączy klasyczne metody fotolizy stacjonarnej z nowoczesnymi technikami analitycznymi, uzyskując pełny obraz reaktywności halogenowych pochodnych 4-tio-2'-deoksyurydyny. W badaniach z kontrolowanym naświetlaniem UVA (320–400 nm) określono zarówno kinetykę fotodegradacji, jak i charakter głównych produktów reakcji. Otrzymane wyniki są spójne z przewidywaniami fotochemicznymi dla układów tiourydynowych, w których obecność siarki modyfikuje przebieg relaksacji stanów wzbudzonych. Cennym rezultatem jest kompleksowa identyfikacja produktów fotolizy: dimerów disiarczkowych, produktów odsiarczonych (SdU) oraz urydynowych pochodnych powstałych w wyniku dehalogenacji. Autorka trafnie zauważa konkurencję między mechanizmami redukcyjnym i oksydacyjnym zachodzącymi w procesach fotochemicznych oraz znaczenie środowiska dla przebiegu reakcji. Analizy elektronowych widm absorpcyjnych wraz z obliczeniami TD-DFT stanowią mocny punkt tej części pracy i pokazują dobre zrozumienie zależności między strukturą elektronową a fotoaktywnością badanych związków. Wnioski dotyczące różnic w reaktywności BrSdU i ISdU są

przekonujące i dobrze uzasadnione: dla BrSdU dominującym procesem jest dehalogenacja z tworzeniem produktów odsiarczonych, natomiast ISdU częściej ulega reakcjom addycji, prowadzącym do stabilnych fotoadduktów. To ważna obserwacja, ponieważ wskazuje na odmienny charakter uszkodzeń powstających po absorpcji światła, co może mieć znaczenie biologiczne. W dyskusji Autorka poprawnie odnosi się do mechanizmów fotochemicznych, opisując rolę wzbudzonych stanów trypletowych i singletowych oraz procesów fotoindukowanego przeniesienia elektronu. Analizy i interpretacje wyników są poprawne i stanowią solidny fundament dla dalszych badań na poziomie DNA i komórek nowotworowych.

Rozdział poświęcony badaniom DNA stanowi naturalne i istotne rozwinięcie wcześniejszych doświadczeń fotochemicznych. Przejście od badań nad wolnymi nukleozydami do analiz ich zachowania w strukturze dwuniciowego DNA zostało przeprowadzone w sposób logiczny i konsekwentny. Autorka właściwie uzasadniła potrzebę tego etapu, podkreślając, że ostatecznym miejscem działania badanych fotosensybilizatorów są struktury kwasów nukleinowych. Strategia syntezy oligonukleotydów z pojedynczymi modyfikacjami i ich ekspozycja na promieniowanie UVA umożliwiły identyfikację i opis konkretnych produktów fotochemicznych powstających w bezpośrednim sąsiedztwie zmodyfikowanej zasady. Dzięki temu możliwe było prześledzenie lokalnych efektów fotoindukowanej reaktywności we właściwym układzie modelowym. Najbardziej oryginalnym wynikiem tej części rozprawy jest wykazanie odmiennego mechanizmu fotoreakcji BrSdU i ISdU w obrębie DNA. Autorka trafnie wskazuje, że atom siarki, dzięki właściwościom elektronodonorowym, zmienia kierunek przeniesienia elektronu po wzbudzeniu i stabilizuje produkty addycji. Mechanizm może mieć istotne znaczenie biologiczne, gdyż zamiast gwałtownych pęknięć DNA dochodzi do powstawania trwałych połączeń między zasadami, które zaburzają replikację i transkrypcję w sposób subtelny, ale długotrwały. W tym sensie 4-tioanalogi można traktować jako potencjalne fotosensybilizatory o łagodniejszym, kontrolowanym działaniu. Analizy HPLC i LC–MS/MS przeprowadzone na zdegradowanych próbkach DNA umożliwiły identyfikację produktów. Interpretacja widm została wykonana starannie i z zachowaniem standardów analitycznych. Widać, że Doktorantka doskonale orientuje się w literaturze przedmiotu i umiejętnie wykorzystuje wcześniejsze wyniki grupy Prof. Janusza Raka. Na podkreślenie zasługuje prezentacja wyników: czytelne chromatogramy, widma i schematy reakcji z logiczną interpretacją. Otrzymane wyniki znacząco poszerzają wiedzę o mechanizmach fotoindukowanych uszkodzeń materiału genetycznego i stanowią ważny punkt wyjścia dla dalszych badań nad nukleozydowymi fotosensybilizatorami.

Część biologiczna stanowi ważne dopełnienie badań mechanistycznych, a zarazem kluczowy etap weryfikacji założeń pracy czyli ocenę potencjału badanych pochodnych jako fotosensybilizatorów w

warunkach komórkowych. Już sam zakres przeprowadzonych badań, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodologicznym Doktorantki i interdyscyplinarnym charakterze pracy. Eksperymenty wykonano na linii raka prostaty PC3, co stanowi uzasadniony wybór z uwagi na kontekst kliniczny badań. Wyniki testów MTT potwierdziły, że zarówno BrSdU, jak i ISdU są nietoksyczne w ciemności, natomiast po ekspozycji na promieniowanie UVA wykazują wyraźny, zależny od dawki efekt fotocytotoksyczny. Na szczególne uznanie zasługuje zastosowanie testu klonogenego przeżycia komórek (clonogenic assay), który, w przeciwieństwie do prostych testów metabolicznych, ocenia długoterminową zdolność komórek do proliferacji po zakończeniu ekspozycji. Wyniki jednoznacznie wskazują, że połączenie UVA z obecnością badanych tionukleozydów prowadzi do istotnego spadku liczby kolonii, szczególnie dla ISdU przy wyższych dawkach światła. Wynik ten sugeruje, że efektywność terapii można modulować odpowiednim doбором dawki promieniowania i potwierdza, iż ISdU jest bardziej efektywnym fotosensybilizatorem. Analiza cyklu komórkowego oraz oznaczenie markerów uszkodzeń DNA wykazały zatrzymanie komórek w fazie G2/M i wzrost poziomu fosforylowanego histonu γ H2A.X - jednoznacznego wskaźnika powstawania dwuniciowych pęknięć DNA.

Cennym uzupełnieniem jest analiza generowania reaktywnych form tlenu (ROS) przy użyciu sondy DCFH-DA. Wzrost sygnału fluorescencji w próbkach naświetlanych w obecności BrSdU i ISdU potwierdza intensywną generację ROS jako bezpośredni efekt fotoaktywacji. W eksperymentach zastosowano właściwe kontrole z donorami ROS, co zwiększa wiarygodność danych. Chociaż ta pośrednia metoda detekcji ROS jest powszechnie stosowana i pozwala potwierdzić ogólny stres oksydacyjny, nie umożliwia jednak rozróżnienia poszczególnych indywiduów chemicznych ani określenia dominującego mechanizmu fotodynamicznego.

1. W tym kontekście chciałbym zapytać o możliwość zastosowania bardziej selektywnych metod detekcji ROS, które mogłyby poszerzyć i tak bogaty zestaw technik pomiarowych wykorzystanych w rozprawie, na przykład bardziej specyficznych sond chemicznych (dla $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$) lub pomiarów spektroskopowych. Czy Autorka rozważała takie podejście lub widzi potencjał ich zastosowania w przyszłych badaniach nad mechanizmami fotodynamicznymi badanych związków?
2. Wykazano, że ISdU jest bardziej fototoksyczny przy wyższych dawkach światła, mimo mniej efektywnej inkorporacji do DNA niż BrSdU. W pracy zasygnalizowano to zjawisko, jednak bez szerszej interpretacji jego przyczyn. Czy Autorka mogłaby rozwinąć ten wątek? Czy różnice te można tłumaczyć większą wydajnością generacji ROS wynikającą z obecności atomu jodu, co może sprzyjać przejściom międzysystemowym? Czy można również rozważyć udział alternatywnych

mechanizmów fotochemicznych lub wpływ właściwości fizykochemicznych ISdU, które mogłyby przekładać się na jego większą skuteczność fotodynamiczną?

3. Wyniki rozprawy jednoznacznie wskazują, że badane halogenowe pochodne 4-tio-2'-deoksyurydyny nie prowadzą do klasycznych pęknięć nici DNA, lecz do tworzenia trwałych fotoadduktów między zasadami. Jakie znaczenie biologiczne, Pani zdaniem, może mieć ten odmienny typ uszkodzeń? Czy tego rodzaju modyfikacje mogą aktywować określone szlaki odpowiedzi komórkowej, czy raczej powodują bardziej subtelny, długotrwały efekt replikacyjny, związany z utrudnionym odczytem matrycy DNA?
4. W pracy skoncentrowano się wyłącznie na komórkach nowotworowych, co stanowi pewne ograniczenie interpretacyjne, zwłaszcza że komórki nowotworowe z reguły wykazują wyższy bazowy poziom ROS i tym samym większą wrażliwość na stres oksydacyjny, co może potęgować efekt zarówno radioterapii jak i PDT. Czy Autorka rozważała wykonanie badań porównawczych na komórkach prawidłowych, które mogłyby posłużyć jako kontrola selektywności działania? Jaką linię komórkową uznałaby za najbardziej odpowiednią do takiego porównania i jakie dalsze eksperymenty mogłyby pomóc w zrozumieniu różnic pomiędzy komórkami prawidłowymi a nowotworowymi?
5. Biorąc pod uwagę, że nowotwór prostaty jest guzem dobrze unaczynionym, czy Autorka rozważa możliwość rozszerzenia badań na modele trójwymiarowe lub naczyniowy w celu oceny wpływu na mikrośrodowisko guza i interakcje komórek śródbłónki z badanymi sensybilizatorami?
6. Na zakończenie chciałbym zapytać, który z uzyskanych wyników uważa Pani za najistotniejszy dla dalszego rozwoju tej tematyki i jakie kierunki dalszych badań uznaje Pani za kluczowe dla potwierdzenia potencjału terapeutycznego badanych pochodnych?

Powyższe pytania mają charakter dyskusyjny i wynikają z chęci pogłębienia interpretacji, nie podważają jednak rzetelności i poprawności wykonanych badań. Rozprawa mgr Anny Czai pokazuje, że z pozornie prostych układów nukleozydowych można wydobyć nowe mechanizmy fotochemiczne o istotnym znaczeniu biologicznym. Uzyskane wyniki wskazują na duży potencjał dalszego rozwoju tej tematyki, zarówno w wymiarze podstawowym, związanym z poznaniem natury reakcji fotochemicznych w DNA, jak i aplikacyjnym, obejmującym projektowanie nukleozydowych fotosensybilizatorów nowej generacji. Autorka udowodniła, że potrafi prowadzić badania o dużym stopniu złożoności, łącząc precyzję chemiczną z warsztatem biologicznym. Jej praca stanowi znakomity przykład badań translacyjnych, w których wyniki o charakterze podstawowym harmonijnie łączą się z perspektywą zastosowań terapeutycznych.

Rozprawa doktorska mgr Anny Czai pt. „*Pochodne halogenowe 4-tiourydyny jako fotosensybilizatory uszkodzeń DNA*” spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Jest to praca interdyscyplinarna, łącząca elementy fotochemii, chemii teoretycznej i biologii molekularnej, w której Autorka zrealizowała ambitny i trudny cel badawczy, jakim jest zrozumienie mechanizmów fotoreaktywności halogenowych pochodnych 4-tio-2'-deoksyurydyny i określenie ich potencjału przeciwnowotworowego. Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną, interdyscyplinarność i staranność redakcyjną rozprawy, a także imponujący dorobek naukowy Autorki, stwierdzam z pełnym przekonaniem, że praca ta spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk chemicznych i wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Czai do publicznej obrony przed Wysoką Radą Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego.

Jednocześnie, podkreślając oryginalność przedstawionych wyników, interdyscyplinarny charakter badań oraz znaczący dorobek publikacyjny (siedem publikacji o sumarycznym IF = 46,2, rozdział w monografii wyd. *Springer Nature* i dwa zgłoszenia patentowe), pragnę z całą mocą zaznaczyć, że rozprawa ta zasługuje na **wyróżnienie**.

Łączę wyrazy szacunku,

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ