



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Fizycznej



80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18, tel. (+48 58) 523 5331, fax (+48 58) 523 5464, e-mail: bla@chem.ug.edu.pl,  
[www.chem.ug.edu.pl](http://www.chem.ug.edu.pl)

Prof. dr hab. inż. Jerzy Błażejowski  
profesor zwyczajny

Gdańsk, 14 listopada 2012 roku

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Marii Polskiej  
z tytułem

„Degradacja fragmentów DNA zawierających bromopochodne zasad nukleinowych pod  
wpływem niskoenergetycznych elektronów lub promieniowania UV”  
przedstawionej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego (UG) celem uzyskania  
stopnia doktora nauk chemicznych w zakresie chemii

Rozprawa doktorska obejmuje wyniki badań dotyczących: (i) degradacji modelowych nukleotydów znakowanych bromem powodowanej niskoenergetycznymi elektronami, (ii) stymulowanej elektronami desorpcji (ESD) anionów do fazy gazowej z nukleotydów znakowanych bromem (iii) inicjowanej promieniowaniem UV degradacji 5-bromo-2'-deoksyurydyny w fazie wodnej zawierającej aceton i izopropanol oraz (iv) syntezy całkowicie znakowanego 5-bromo-2'-deoksyurydynam nienatywnego plazmidu i określenie jego podatności na fotodegradację (przejawiającą się pękaniem nici DNA) powodowaną promieniowaniem UV. Tematyka rozprawy mieści się w obszarze badań rozwijanych od lat w grupie profesora Janusza Raka na Wydziale Chemii UG oraz w wielu ośrodkach zagranicznych, zogniskowanych na poszukiwaniu zmodyfikowanych nukleotydów, które mogły by być wbudowane do DNA jako fragmenty (uczulacze) podatne na działanie niskoenergetycznych elektronów lub promieniowania nadfioletowego. Związki takie są interesujące pod kątem ich wykorzystania w dynamicznej radioterapii lub fototerapii przeciwnowotworowej. Tematyka rozprawy wkomponowuje się w główny nurt zainteresowań współczesnej chemii. Jest interesująca poznawczo. Dotyka również aspektów aplikacyjnych.

WYDZIAŁ CHEMII UG

Wpłynęło dnia 14. 11. 2012

Podpis J. Pięć



W tym kontekście wybór tematyki należy uznać za trafny i idący naprzeciw oczekiwaniom sformułowanym pod adresem środowisk badawczych.

Rozprawa doktorska podzielona jest na pięć rozdziałów: wstęp, cel pracy, metodyka badań, dyskusja wyników oraz podsumowanie i wnioski. We wstępie autorka rozprawy omówiła zagadnienia dotyczące: oddziaływania promieniowania jonizującego z materią żywą, oddziaływania niskoenergetycznych elektronów z cząsteczkami, uszkodzeń DNA powodowanych niskoenergetycznymi elektronami oraz wykorzystania pochodnych halogenowych zasad nukleinowych jako radio- i fotosensybilizatorów. W rozdziale drugim kandydatka sprecyzowała cele podejmowanych badań. W rozdziale trzecim autorka opisała szczegółowo użyte w badaniach substancje, stosowaną aparaturę oraz wykorzystywane metody badawcze. Rozdział czwarty obejmuje dyskusję wyników uzyskanych w trakcie realizacji zarysowanych na wstępie celów badawczych. Rozprawę kończy podsumowanie zgromadzonych wyników wraz ze zwięźle sformułowanymi wnioskami. Tekst rozprawy zawiera odnośniki do 175 prac oryginalnych lub przeglądowych. Jest również uzupełniony wykazem używanych skrótów. W suplemencie zamieszczone są kopie 3 publikacji, na bazie których rozprawa została przygotowana (są to dwie prace w: J. Phys. Chem. B (IF = 3,696) i jedna praca w J. Chem. Phys (IF = 3,333) – w dwóch z nich kandydatka jest pierwszym autorem). Kandydatka jest ponadto współautorem trzech prac – po jednej w: J. Phys. Chem. B (IF= 3,696), J. Pharm. Biomed. Anal. (IF= 2,967) oraz BMC Biochemistry (IF = 2,000) – które jak deklaruje nie wchodzą w zakres rozprawy (tematyka dwóch z nich zajął się do pewnego stopnia z niepublikowanym fragmentem rozprawy). Kandydatka jest ponadto współautorem 11 prezentacji konferencyjnych.

Istotne osiągnięcia rozprawy doktorskiej scharakteryzowane są poniżej.

- Badania wykazały, że działanie niskoenergetycznych elektronów (o energii 10 eV) na trimery znakowane bromem w obrębie urydyny, cytozyny, adenozyiny i guanozyny powoduje głównie usuwanie atomu halogenu i odtworzenie natywnych trimerów, a w mniejszym stopniu uwalnianie tyminy oraz niewielkich ilości monofosforanów. Stwierdziła, że znakowane w obrębie jednej z zasad nukleinowych trimery są w różnym stopniu ale zawsze bardziej wrażliwe na degradację w tych warunkach niż układy natywne, co czyni bromopochodne zasad potencjonalnymi radiosensybilizatorami DNA mogącymi znaleźć zastosowania w skojarzonej radioterapii przeciwnowotworowej.
- Badania dowiodły, że w wyniku działania elektronów o energii 0–20 eV na natywne i podstawione bromem trimery (wymienione powyżej) zaadsorbowane na



powierzchni złota uwalniane są aniony:  $\text{H}^-$ ,  $\text{CH}_3^-/\text{NH}^-$ ,  $\text{O}^-/\text{NH}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$  i  $\text{CN}^-$  (oraz  $\text{Br}^-$  w przypadku bromopochodnych) w drodze bądź to dysocjacyjnego przyłączenia elektronów (gdy energia elektronów jest rzędu 5–9 eV), bądź bipolarnej dysocjacji (gdy energia elektronów sięga 13–14 eV). Analiza relacji między stosunkami ilościowymi uwalnianych jonów umożliwiła wskazanie dróg ich powstawania. Podobna analiza umożliwiła ocenę podatności bromowanych oligonukleotydów na uwalnianie jonów  $\text{Br}^-$  a przez to ich użyteczności jako potencjalnych radiouczulaczy.

- Badania wykazały, że naświetlanie 5-bromo-2'-deoksyurydyny w układach woda/izopropanol/acetone promieniowaniem o długości fali 300 nm prowadzi do zaniku związku z wydajnością kwantową 0,63 oraz pojawienia się w porównywalnych ilościach 2'-deoksyurydyny i adduktu ostatniego związku z izopropanolem. Podobieństwa w zachowaniu 5-bromo-2'-deoksyurydyny naświetlanej promieniowaniem elektromagnetycznym oraz poddanej działaniu niskoenergetycznych elektronów stwarzają przesłanki do użycia pierwszej z metod do oceny radioaktywności wyżej wymienionego połączenia jak i innych halogenowych pochodnych zasad nukleinowych.
- Badania dowiodły, że sztuczny plazmid znakowany całkowicie 5-bromo-2'-deoksyurydyną, otrzymany metodami biologii molekularnej, stanowi dogodny układ do badania (metodą elektroforezy agarowej) wydajności pojawiania się pęknięć w molekułach DNA poddanej działaniu promieniowania nadfioletowego.

Obszerny materiał doświadczalny przedstawiony w rozprawie przez kandydatkę jest efektem przeprowadzenia przez nią wszechstronnych badań, w których wykorzystane zostały techniki umożliwiające: analizę produktów oddziaływania związków z niskoenergetycznymi elektronami, rejestrację widm mas uwalnianych w efekcie stymulowanej elektronami desorpcji anionów (ESD), analizę produktów fotolizy 5-bromo-2'-deoksyurydyny w wyniku absorpcji promieniowania nadfioletowego (HPLC, MS, obliczeniowe) oraz syntezę sztucznego plazmidu DNA znakowanego 5-bromo-2'-deoksyurydyną (biologii molekularnej) i wykorzystanie go do oceny pęknięć pojawiających się w cząsteczce DNA poddanej działaniu promieniowania nadfioletowego.

Ilość danych doświadczalnych zgromadzonych w rozprawie jest duża i świadczy o wszechstronnym zaangażowaniu kandydatki w realizację badań. Wyniki przedstawione są w rozprawie lub załączonych publikacjach. Fakt opublikowania większości wyników i włączenia ich do ogólnoludzkich zasobów wiedzy świadczy, że zyskały one aprobatę międzynarodowej społeczności naukowej.



Praca napisana jest na ogół starannie i klarownie. Drobnych błędów literowych nie wymieniam. Kilka niedopatrzeń przytaczam poniżej.

- Kilkakrotnie w tekście rozprawy pojawia się słowo „rezonans” lub „rezonanse”, którego znaczenie nie jest jasne – na przykład na stronie: 26 wiersze 10–13 od dołu, 29 wiersze 5–8 od góry i wiersz 10 od dołu, 32 wiersze 10–15 od góry („... rezonansowy wychwyty elektronów...”), 89 wiersze 7–9 od dołu („... rezonansowe przyłączenie elektronu do molekuly ...”), 90 wiersze 8–9 od góry („sygnał ESD jonów wodorowych ( $H^-$ ) stanowi szeroka struktura rezonansowa (DEA)...”), 90 wiersze 6–8 od dołu („... rezonans o energii 8,5–10 eV odpowiada właśnie uwolnieniu  $H^-$  z grupy  $CH_3^-$ ”), 90 wiersze 4–6 od dołu („niewielkie przesunięcie maksimum rezonansu ...”), 92 wiersze 8–9 od dołu („widmo ESD jonów  $CH_3^-/NH^-$  posiada strukturę rezonansową rozpoczynającą się przy 6 eV i przechodzącą przez maksimum przy około 8,5 eV”), 93 wiersze 11–12 od dołu („desorpcja rezonansowa rozpoczyna się przy energii 5 eV, ...”), 94 wiersze 11–12 od dołu („wyraźną desorpcję rezonansową anionu  $OH^-$  ...”), 95 wiersze 9–10 od góry („wreszcie kształt i pozycja sygnału DEA desorbowanych z TBrXT jonów  $OH^-$  przypomina rezonans  $Br^-$  ...”).
- W tekście kilkakrotnie pojawia się określenie „spektroskopia masowa”, zamiast „spektroskopia mas”, względnie „widmo masowe”, „zamiast widma mas” – na przykład na stronie: 51 wiersz 2 od dołu, 66 wiersze 6–7 od góry („analyzer masowy”, zamiast „analyzer mas”), 70 wiersze 1–4 od góry, 105 wiersze 1–3 od góry, 105–106 podpisy pod rysunkami IV.3.6 i IV.3.7, 107 wiersze 4–7 i 12–14 od góry oraz podpis pod rysunkiem IV.3.8.
- Zbędny jest jeden z wyrazów „tworzenia” lub „powstawania” w opisie rysunków I.4.19 (strona 53) i I.4.20 (strona 54).
- W zdaniu na stronie 108 (wiersze 5–7 od góry) zbędne jest słowo charakterystyk.
- W zdaniu na stronie 111 (wiersze 11–13 od dołu) zbędne jest słowo „wspomnianego” (lub „wymienionego”).
- Czy istnieje jakiś szczególny powód, aby podawać wartości powierzchni prążków i odchylenia standardowego z dokładnością do 8 cyfr znaczących (tabele IV.4.3 i IV.4.4 na stronach 128 i 129).

Podsumowując, rozprawa doktorska jest wartościowym zbiorem wiedzy dotyczącej radio- oraz fotoreaktywności prostych znakowanych bromem oligonukleotydów oraz sztucznego plazmidu DNA. Zgromadzony materiał dowodzi, że kandydatka opanowała podstawowe



techniki warsztatu naukowego i jest przygotowana do samodzielnego projektowania i prowadzenia badań.

Biorąc powyższe przesłanki pod uwagę uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe (w świetle ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. nr 65 poz. 595, z późn. zm.), a także rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 15 stycznia 2004 roku (Dz.U. nr 15 poz. 128, z późn. zm.)) oraz zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim.

Wnoszę o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

