



UNIwersYTET GDAŃSKI



ADAMI MARI VIA TUA

WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Fizycznej



CHEMIA UG

80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. (+48 58) 52 35 111, fax (+48 58) 523 5012, e-mail: jerzy.blazejowski@ug.edu.pl,
www.chem.ug.edu.pl

Prof. dr hab. inż. Jerzy Błażejowski
profesor zwyczajny

Gdańsk, 24 kwietnia 2014 roku

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgra Krzysztofa Komodzińskiego zatytułowanej
„Badania właściwości fotochemicznych azydonukleozydów purynowych w kontekście ich
potencjalnego wykorzystania jako czynników fotoszysywających w dwuniciowych układach
oligonukleotydowych” przedstawionej Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama
Mickiewicza w Poznaniu celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych w dyscyplinie
chemia

Rozprawa doktorska opisuje wyniki badań skupionych na syntezie wywodzących się od adeniny azydonukleozydów, ich prekursorów i analogów oraz jedno i dwuniciowych oligonukleotydów zawierających azydonukleozydowe fragmenty, a także fotoreaktywności wymienionych wyżej związków badanej pod kątem ich wykorzystania jako czynników szysywających w dwuniciowych układach oligonukleotydowych. Badania były ukierunkowane na poszukiwanie związków mogących znaleźć zastosowania w terapii przeciwnowotworowej. Prowadzono je z zastosowaniem najnowocześniejszych metod syntezy (klasycznych, PCR), rozdziłu (HPLC) i identyfikacji (HR MS, NMR, UV-VIS) złożonych molekuł i makromolekuł. Tematyka rozprawy wkomponowuje się w główny nurt badań współczesnej chemii i biochemii. Jest interesująca poznawczo i pod kątem potencjalnych zastosowań medycznych. W pełni spełnia kanony nowoczesnych badań naukowych. W tym kontekście wybór tematyki rozprawy uznać należy za trafny i idący naprzeciw oczekiwaniom kierowanym pod adresem środowisk naukowych.

Rozprawa doktorska podzielona jest na rozdziały w sposób typowy dla prac z zakresu nauk przyrodniczych. We *Wprowadzeniu* Kandydat zarysowuje historię badań nad wpływem promieniowania UV na kwasy nukleinowe. *Część literaturowa* skupiona jest na: problematyce fotochemii pochodnych azydowych związków aromatycznych, syntezie i właściwościach pochodnych azydowych nukleozydów purynowych oraz zagadnieniach fotozszywania. Rozdział trzeci zatytułowany *Cel pracy* precyzuje obszar badań podjętych w trakcie przygotowywania rozprawy. W rozdziale kolejnym zatytułowanym *Badania własne* opisane są syntezy i badania fotochemiczne pochodnych azydowych nukleozydów purynowych oraz jedno- i dwuniciowych oligonukleotydów z wkomponowanymi azydopurynami. W rozdziale piątym zatytułowanym *Podsumowanie* Kandydat uwypukla najistotniejsze osiągnięcia rozprawy. W kolejnym rozdziale zatytułowanym *Część doświadczalna* podane są stosowane odczynniki, wyszczególniona jest aparatura, a także opisane są szczegółowo syntezy związków oraz warunki prowadzenia badań i wyniki analiz spektralnych. Rozprawę kończy spis literatury obejmujący 177 pozycji, w tym 3 prace, w których Kandydat występuje jako pierwszy autor (dwie prace opublikowane w *Tetrahedron Lett.* (IF = 2.803) i jedna praca opublikowana w *Photochem. Photobiol. Sci.* (IF = 2.923)). Do rozprawy dołączone jest streszczenie w języku angielskim, jak i inne informacje (na początku).

Istotne odkrycia i osiągnięcia rozprawy doktorskiej scharakteryzowane są poniżej.

- Zsyntezowanie 30 azydopodstawionych w pozycjach 2 lub/i 6 nukleozydów purynowych, ich analogów, prekursorów lub pochodnych oraz potwierdzenie autentyczności związków metodami spektralnymi (MS, NMR, UV-VIS).
- Zbadanie przemian fotochemicznych wywołanych promieniowaniem UV ($\lambda < 300$ (313) nm) otrzymanych nukleozydów purynowych (1), ich metylowych analogów (1) i acetylowych pochodnych (4) w roztworach wodnych, zachodzących w obecności lub pod nieobecność tlenu, w drodze monitorowania zmian absorpcji w czasie oraz dogłębnej analizy produktów (powstałych w trakcie naświetlań preparatywnych, metodami HR MS i NMR) rozdzielonych metodą HPLC, która umożliwiła określenie ich struktury.
- Wykazanie, że tlen nie wpływa na przemiany fotochemiczne 6-azydo-9- β -D-rybofuranozylopuryny i że w ich trakcie powstaje związek z powiększonym pierścieniem purynowym (1-(β -D-rybofuranozylo)-4,6-dihydroimidazo[4,5-*f*][1,3,5]triazepin-5(1*H*)-on) będący analogiem koformycyny – naturalnego nukleozydu o właściwościach przeciwnowotworowych (analog metylowy nukleozydu zachowuje się podobnie); wykazanie, że związek z powiększonym pierścieniem purynowym wykazuje wysoką

aktywność cytostatyczną względem komórek nowotworowych nosogardzieli (KB), piersi (MCF-7) i szyjki macicy (HeLa).

- Wykazanie, że przemiany fotochemiczne acetylowych pochodnych nukleozydów purynowych (4) są zależne od budowy związków i obecności tlenu w układzie reakcyjnym; w produktach stwierdza się zawsze związki, w których w miejscu ugrupowania azydowego pojawia się grupa aminowa, a w przypadku naświetlań w obecności tlenu – nitrowa (powstałe nitropochodne nukleozydów purynowych nie były dotychczas opisane); niektóre produkty (dotychczas nieopisane) podlegają dalszym przemianom, w tym diastereoizomeryzacji.
- Otrzymanie jednoniciowego oligonukleotydu zawierającego w łańcuchu resztę 6-azydo-9- β -D-rybofuranosylopuryny (6-azydonebularyny) oraz dwuniciowych oligonukleotydów zawierających wyżej wymieniony oligonukleotyd i 4 różne oligonukleotydy z komplementarnymi zasadami nukleinowymi względem 6-azydo-9H-puryny.
- Wykazanie, że naświetlenie (promieniowaniem $\lambda < 300$ (313) nm) jednoniciowego oligonukleotydu z wkomponowaną resztą 6-azydonebularyny prowadzi do powstania oligonukleotydu z powiększonym w tym miejscu pierścieniem purynowym, zaś dwuniciowych oligonukleotydów – do kowalencyjnego łączenia nici z utworzeniem produktów typu „*crosslink*”; 6-azydo-9H-puryna zawsze łączy się z resztą adeniny w nici komplementarnej.

Ilość danych zgromadzonych w pracy jest ogromna i świadczy o dużym zaangażowaniu Kandydata w realizację badań. Wyniki przedstawione są szczegółowo, podobnie jak stosowane metody badawcze. Dyskusja i wnioski oparte są o szczegółową i rzetelną analizę danych uzyskanych różnymi metodami badawczymi. Praca napisana jest starannie i klarownie. Drobnych niedopatrzeń nie wyszczególniam. Istotniejsze lub wymagające komentarza uwagi wymieniam poniżej.

Uwagi ogólne

- Pomocne byłoby podanie numerów atomów w nukleozydach na schemacie 19 (str. 28).
- Nie wiadomo, co jest źródłem tlenu w trakcie utleniania związku 54 do 55 – proces prowadzony jest w etanolu w obecności Cl₂ (Schemat 21, str. 29).
- Na stronie 35, gdzie rozważana jest tautomeria azydo-tetrazolowa 2,6-diazydopuryny użyto określeń „formy tautomeryczne”, a w innym miejscu „izomery”; co to są/jest tautomery/tautomeria, a co izomery/izomeria?

- Schemat 51 (str. 58) wydaje się niekompletny. Pod strzałką powinna być dodana cząsteczka wody uwzględniona na schemacie 52 (str. 59) w celu wyjaśnienia powstawania fotoproduktu z powiększonym pierścieniem purynowym; pozostaje natomiast niewyjaśnione, z czym reaguje nitren aby powstała pochodna (metylowa lub cukrowa) adeniny. Podobne niejasności pojawiają się na schematach: 56 (str. 64: co jest źródłem atomów wodoru w trakcie przekształcenia nitrenu w **K28** oraz jak powstaje **K29** i jak przekształca się on w **K13**), 58 (str. 67: co jest źródłem atomów wodoru przy przekształcaniu nitrenu w **K28** oraz jak powstaje **K30**), 62 (str. 73: nie wskazano skąd pochodzą atomy wodoru niezbędne do przekształcenia nitrenu w **K21** lub **K13** oraz tlenu do przekształcenia nitrenu w **K13** lub **K32**, nie zasugerowano też w jaki sposób mógłby powstać **K31**).

Uwagi szczegółowe

- Produkt przejściowy **3** w fazie gazowej (Schemat 2, str. 20) traci nie proton (str. 19 dół) ale odszczepia atom wodoru.
- Zamiast „intermediat” (str. 25 dół) trafniej byłoby użyć określenia „produkt pośredni”.
- Budowa związku **56** wymienionego na str. 29 nie jest zamieszczona w tekście.
- Niejasne jest, co kryje się w sformułowaniu „dobrej grupy opuszczającej” (str. 30, powyżej schematu 23; str. 31, wiersz 5 od dołu).
- Czy na str. 30 (wiersz 2 od dołu) nie powinno być „azotanem (III) izo-amylu”, zamiast azotynem izo-amylu (wcześniej w tekście kwas azotawy określony został jako kwas azotowy (III))? Określenie azotyn pojawia się również na stronie 31 (powyżej schematu 25).
- Nietrafnie sformułowane jest zdanie na stronie 33 (wiersze 14-15 od góry); środowisko (roztwór) jest obojętne, zasadowe lub kwaśne, a nie pH.
- Numer schematu na str. 57 (wiersz 9 od góry) jest prawdopodobnie niewłaściwy; czy zamiast „9” nie powinno być „50”?
- W różnych miejscach tekstu pojawia się termin widmo masowe/analiza masowa; powinno być widmo mas/analiza mas
- Na opisanym niepełnie schemacie 59 (str. 71) nie zaznaczono, który ze związków to **K31**, a który **K33/33***.

Podsumowując, rozprawa doktorska jest wartościowym zbiorem wiedzy na temat syntezy i fotochemii wywodzących się od adeniny azydonukleozydów, ich analogów metylowych i pochodnych acetylowych oraz jedno- i dwuniciowych oligonukleotydów

zawierających fragmenty azydonukleozydowe, pod kątem ich wykorzystania jako czynników zszywających w dwuniciowych układach nukleotydowych. Pokazuje również możliwości uzyskiwania interesujących poznawczo i aplikacyjnie związków na drodze fotochemicznej. Zgromadzony w rozprawie materiał dowodzi, że Kandydat w pełni opanował tajniki warsztatu naukowego i jest przygotowany do samodzielnego projektowania i prowadzenia badań.

Biorąc powyższe przesłanki pod uwagę uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska w pełni 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 wydanego na jej podstawie 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.

Biorąc pod uwagę wysokie walory poznawcze rozprawy oraz fakt opublikowania znacznej części wyników (poza dotyczącymi fotoszywania) w wysoko notowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym uważam, że może być rozważone uznanie jej za wyróżniającą się.

