

Kraków, 16.11.2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Krancewicz pt. „*Synteza, właściwości spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne tricyklicznych analogów tiopuryn o potencjalnych zastosowaniach biologicznych*” wykonanej pod opieką naukową Prof. dr hab. Bronisława Marciniaka oraz dr Katarzyny Taras-Goślińskiej**

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na oficjalne pismo Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Prof. dr hab. Macieja Kubickiego z dn. 30.10.2023, w związku z prowadzeniem przewodu doktorskiego Pani mgr Katarzyny Krancewicz i powierzeniem mi przez Radę Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne UAM roli recenzenta.

Pierwsze stosowane do dzisiaj leki będące pochodnymi tiopuryn opracowano już w latach 40. XX wieku. Kolejne, pogłębione badania nad właściwościami antyproliferacyjnymi tej grupy związków zaowocowały zatwierdzeniem 6-merkaptopuryny (6MP) oraz azatiopryny przez Agencję Żywności i Leków (FDA). Właściwości tiopuryn, w tym ich zdolność do generowania reaktywnych form tlenu, aktywność przeciwnowotworowa oraz przeciwbakteryjna, pożądane właściwości farmakokinetyczne przejawiające się zwiększoną selektywnością działania, oraz niezwykle ciekawe właściwości optyczne i fotochemiczne sprawiają, że związki te mimo szeregu wad, wciąż są tematem badań wielu zespołów naukowych na świecie. W ten nurt wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa opisująca wyniki badań Doktorantki prowadzonych pod kierunkiem Prof. dr hab. Bronisława Marciniaka oraz Dr Katarzyny Taras-Goślińskiej. Autorka pracy wykazała się dogłębną wiedzą z zakresu chemii medycznej, spektroskopii molekularnej, fotochemii oraz podstaw biologii molekularnej. Zagadnienia podejmowane w pracy stanowią kontynuację badań nad właściwościami spektroskopowymi i fotochemicznymi różnorodnych grup związków. To obszar, w którym Prof. Bronisław Marciniak jest cenionym autorytetem naukowym zarówno w kraju, jak i za granicą. Na wyróżnienie zasługuje poszerzenie klasycznych badań mechanizmów w roztworach o badania biologiczne *in vitro* oraz badania właściwości farmakokinetycznych (określenie profilu ADME). Dlatego praca Doktorantki jest nie tylko aktualna, ale również wpisuje się w szerszy kontekst badań prowadzonych przez czołowych naukowców w tej dziedzinie. Tematyka badawcza i kompetencje Doktorantki podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej doskonale korespondują z tym interdyscyplinarnym polem badań.



Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy 202 strony i została przygotowana w języku polskim. Praca została napisana bardzo starannie i przejrzysto, poprawną polszczyzną, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Praca ma typowy dla opracowań z zakresu chemii format i zawiera 7 głównych rozdziałów: 1) wstęp przedstawiający motywację podjętych badań; 2) część literaturową; 3) rozdział, w którym Doktorantka definiuje dwanaście szczegółowych celów pracy; 4) rozdział poświęcony omówieniu wyników oraz ich analiza i dyskusja 5); część eksperymentalna poświęcona opisowi materiałów i metod pomiarowych stosowanych w pracy; 6) podsumowanie rozprawy i wnioski; 7) spis literatury. Ponadto, zasadnicza część rozprawy poprzedzona jest spisem stosowanych skrótów, perfekcyjnie napisanymi streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz opisem osiągnięć naukowych Doktorantki.

Tytuł rozprawy doktorskiej odpowiada zaprezentowanym w pracy wynikom badań, których cel i zakres tematyczny zostały jasno i precyzyjnie zdefiniowane. Główną koncepcją pracy jest synteza oraz charakterystyka spektroskopowa, fotochemiczna oraz badanie właściwości farmakokinetycznych i aktywności biologicznej siedmiu nowych związków należących do grupy tricyklicznych analogów tiopuryn.

Część literaturowa została bardzo dobrze przemyślana, napisana poprawnym językiem naukowym, zawiera liczne schematy i tabele, które doskonale podsumowują aktualny stan wiedzy. Autorka porusza tu szereg istotnych problemów, takich jak wpływ obecności sprzężonych wiązań podwójnych oraz modyfikacji strukturalnych na elektronowe widma absorpcyjne i aktywność biologiczną oraz znacznie bardziej szczegółowo opisuje właściwości fotofizyczne i fotochemiczne badanej grupy związków. Przy tak szerokim ujęciu nietrudno o popełnienie błędów czy przedstawienie pewnych zagadnień zbyt lakonicznie, czego moim zdaniem Autorce udało się uniknąć. Rozdział ten spełnia zatem swoją bardzo ważną rolę, gdyż umożliwia czytelnikowi rozprawy doktorskiej zrozumienie istoty podjętych badań i stanowi odpowiednie wprowadzenie w ich złożoną tematykę. Wstęp jest również świadectwem dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do realizacji ambitnych i zróżnicowanych zadań badawczych.

Część, w której Autorka analizuje wyniki przeprowadzonych badań jest przygotowana bardzo dobrze, a dyskusja przeprowadzona w sposób dojrzały i wyczerpujący. Pomyślnie przeprowadzono syntezę pięciu 1,N<sup>2</sup>-eteno pochodnych tiopuryn (TEGua, 6MeTEGua, TEGuo, 6MeTEGua i 6MeTEG) oraz dwóch 1,N<sup>2</sup>-etano analogów (DTEGua i DTEG). Struktury związków potwierdzono za pomocą analizy ESI-MS oraz spektroskopii NMR. W ramach oceny czy otrzymane związki mogą być rozpatrywane jako potencjalne leki, określono profil ADME oraz obliczono podstawowe parametry farmakokinetyczne. Dodatkowo, eksperymentalnie wyznaczono współczynnik podziału oktanol-woda. Wykazano, że tricykliczne analogi



tiopuryn wykazują potencjał przeciwnowotworowy *in vitro*, co świadczy o ich możliwym zastosowaniu biomedycznym. Badania oceny cytotoksyczności otrzymanych związków przeprowadzono na komórkach nowotworowych HeLa oraz komórkach fibroblastów mysich NIH/3T3. Wyznaczone przez Doktorantkę wartości IC<sub>50</sub> oraz współczynniki selektywności SI potwierdziły potencjalne zastosowanie tricyklicznych tionukleozydów jako chemioterapeutyków. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę na dociekliwość wykonującej badania, która przejawiała się we wnikliwej obserwacji traktowanych komórek pod mikroskopem, a następnie zmianę metodologii oceny cytotoksyczności na bardziej wiarygodną. Pozwolę sobie tylko na drobną uwagę, że wciąż najdokładniejszym sposobem oceny przeżywalności komórek jest dość prymitywne zastosowanie błękitu tryptanu i zliczanie komórek w komorze Bürkera. Mimo, że Doktorantka na podstawie własnych eksperymentów i danych literaturowych postuluje mechanizm antyproliferacyjny badanych związków, przeprowadzone badania należy uznać za wstępne. Rozumiem też wybór komórek linii HeLa, gdyż jest do zdecydowanie najchętniej wybierana i najbardziej przebadana linia komórek nowotworowych na świecie. Chciałbym natomiast dopytać jakie inne badania biologiczne należałoby wykonać w celu potwierdzenia aktywności przeciwnowotworowej najbardziej obiecujących pochodnych i na jakich innych modelach komórkowych należałoby je przeprowadzić?

Kolejna, najbardziej rozbudowana część pracy dotyczy omówienia właściwości optycznych, fotofizycznych i fotochemicznych badanych związków w różnych rozpuszczalnikach. Do najciekawszych wniosków z tej części należy zaliczyć wykazanie, że 1,N<sup>2</sup>-eteno analogi fluoryzują ze stanu S<sub>2</sub> natomiast pochodne 1,N<sup>2</sup>-etano wykazywały rzadko spotykaną emisję z dwóch wzbudzonych stanów singletowych (S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub>). Wyznaczone przez Doktorantkę małe wartości wydajności kwantowych fluorescencji wskazują na dezaktywację stanów wzbudzonych cząsteczek w wyniku przejść bezpromienistych. Oczywiście z jednej strony taki wynik może cieszyć, gdyż jest przesłanką do tworzenia potencjalnie długożyjących stanów trypletowych, które są prekursorami ROS (możliwa aplikacja w PDT). Ma to jednak poważne konsekwencje praktyczne, gdyż znacznie trudniej jest badać lokalizację komórkową czy tkankową takich związków. Jakie zatem inne techniki mogłaby Pani zaproponować w celu ilościowego oznaczenia potencjalnych leków w komórkach czy też w krwi/organach w ramach bardziej szczegółowych badań mechanizmów działania przeciwnowotworowego oraz w kierunku eksperymentalnego wyznaczenia parametrów farmakokinetycznych? W kolejnej części omawianego rozdziału potwierdzono, że głównym kanałem dezaktywacji wzbudzonego stanu singletowego 1,N<sup>2</sup>-eteno analogów tiopuryn jest przejście międzysystemowe do stanu T<sub>1</sub> z bliską jednością wydajnością kwantową. Efektywne generowanie stanu trypletowego umożliwia wydajne przekazanie energii na cząsteczkę tlenu, co skutkuje dużą wydajnością



generowania tlenu singletowego. W tym miejscu chciałbym dopytać Doktorantkę, czy biorąc pod uwagę wyznaczone energie oraz czasy życia stanów wzbudzonych, można wykluczyć alternatywny mechanizm fotoidnuowanego przeniesienia elektronu i generowanie form wolnorodnikowych takich jak anionorodnik ponadtlenkowy i ostatecznie rodników hydroksylowych? Ponadto chciałbym zapytać o różne metody detekcji ROS, które Autorka mogłaby wykorzystać w przyszłych badaniach, poszerzając tym samym i tak bogaty zestaw technik pomiarowych. Mimo tych drobnych zastrzeżeń bardzo doceniam holistyczne podejście Doktorantki do prowadzenia badań naukowych. Pani magister doskonale zdaje sobie sprawę z tego, iż w celu pełnego zrozumienia mechanizmów działania tiopuryn, obok przeprowadzenia badań podstawowych, niezbędna jest weryfikacja aktywności biologicznej badanych związków w warunkach *in vitro* poprzedzona określeniem parametrów farmakokinetycznych.

W części eksperymentalnej przedstawiono wykaz stosowanych odczynników chemicznych i materiałów, metodykę przeprowadzonych badań oraz opisano aparaturę pomiarową. Uważam, że opis stosowanych metod spełnia swoją zasadniczą rolę, ponieważ z jednej strony jest swoistym przewodnikiem ułatwiającym wybór odpowiedniej techniki pomiarowej do realizacji skomplikowanych zadań badawczych, ale też zawiera niezbędne informacje umożliwiające odtworzenie warunków eksperymentalnych przez niezależnych badaczy. Na pochwałę zasługuje umiejętne zastosowanie w pracy doktorskiej wielu, skomplikowanych technik badawczych takich jak m. in. czasowo-rozdzielcza spektroskopia emisyjna czy nanosekundowa laserowa fotoliza błyskowa.

W rozważaniach końcowych Autorka dokonuje podsumowania i uporządkowania kluczowych wyników i wniosków zawartych w rozprawie doktorskiej. Przedstawione efekty pracy w sposób jednoznaczny potwierdzają osiągnięcie wszystkich postawionych celów pracy. Należy zaznaczyć, że podsumowanie zostało opracowane w sposób wyczerpujący i merytorycznie poprawny, co jednoznacznie świadczy o zdobyciu przez Doktorantkę umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych i prezentacji uzyskanych wyników. Szczególnie podoba mi się podsumowanie wyników badań w postaci rysunków 46 i 47.

Do najważniejszych osiągnięć pracy, stanowiących jednocześnie element nowości naukowej, zaliczam syntezę siedmiu nowych związków, ich szczegółową charakterystykę spektroskopową, fotofizyczną i fotochemiczną, wyznaczenie najważniejszych parametrów farmakokinetycznych oraz sprawdzenie ich działania przeciwnowotworowego. Na podkreślenie zasługuje fakt przeprowadzenia przez Doktorantkę eksperymentów w szerokim zakresie interdyscyplinarności tj. od projektowania i syntezy, poprzez pełną charakterystykę aż po badania biologiczne *in vitro*.



Przeprowadzone badania stanowią zatem istotne źródło informacji dotyczących wpływu zmian strukturalnych pochodnych tiopuryn na ich właściwości fotofizyczne i fotochemiczne. Otrzymane pochodne kierują naszą uwagę na aspekty kluczowe z punktu widzenia potencjalnego zastosowania tej interesującej grupy związków. Ta problematyka ma szczególne znaczenie w kontekście możliwości dalszej modyfikacji tych związków, z jednej strony, w kontekście klasycznych leków, gdzie unikanie fotogenerowania reaktywnych form tlenu (ROS) jest pożądane, a z drugiej strony, w kontekście opracowywania nowych fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej (PDT). Niewątpliwie istnieje potrzeba pogłębionego zrozumienia wpływu poszczególnych zmian strukturalnych na właściwości fotofizyczne i fotochemiczne pochodnych tiopuryny. Wyniki tych badań mogą stanowić solidną podstawę do celowanej manipulacji strukturalnej w celu uzyskania związków o pożądanych właściwościach terapeutycznych. Należy zwrócić uwagę na potencjalne zastosowanie uzyskanych pochodnych w fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów (PDI), zwłaszcza mając na uwadze udokumentowane powinowactwo niektórych pochodnych do komórek bakteryjnych. Odkrycia w tym obszarze mogą prowadzić do rozwinięcia skutecznych strategii terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście problemów związanych z opornością bakterii na konwencjonalne antybiotyki. Warto zauważyć, że absorpcja niektórych z uzyskanych pochodnych w zakresie niebieskim, pomimo znajdowania się poza zakresem typowego okna fototerapeutycznego, może być korzystna w przypadku PDI, zwłaszcza w warunkach *in vivo* (np. zlokalizowane infekcje skórne). Reaktywne formy tlenu powstałe w wyniku wzbudzenia fotonami z tego zakresu nie powinny prowadzić do uszkodzeń głębiej położonych tkanek prawidłowych. Może wręcz stanowić zaletę, umożliwiając skierowane działanie na komórki bakteryjne bez niepożądanych efektów ubocznych na otaczające zdrowe struktury tkankowe.

Wartość merytoryczną rozprawy mgr Katarzyny Krancewicz potwierdza fakt, że jest to materiał już częściowo opublikowany w postaci dwóch oryginalnych artykułów w bardzo dobrych specjalistycznych czasopismach naukowych (*Int. J. Mol. Sci.*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*) o łącznym współczynniku oddziaływania  $IF=10$ , a więc przepuszczony przez gęste sito wnikliwych recenzji specjalistów w dziedzinie. Dodatkowo, Doktorantka systematycznie rozszerza zakres swoich zainteresowań naukowych i z powodzeniem prezentuje wyniki badań na konferencjach naukowych zarówno tych o zasięgu krajowym jak i międzynarodowym (5 prezentacji). Wysoko oceniam Jej umiejętność nawiązywania kontaktów naukowych, czego odzwierciedleniem jest udokumentowany wyjazd do Stanów Zjednoczonych (University of Notre Dame) mający na celu zbadanie właściwości wzbudzonego stanu trypletowego tricyklicznych analogów tiopuryn w różnych rozpuszczalnikach przy zastosowaniu



nanosekundowej laserowej fotolizy błyskowej. Warte podkreślenia jest współpraca z przemysłem. Już na tym etapie kariery naukowej Doktorantka zdaje sprawę nie tylko z istotności badań podstawowych, ale też ich ewentualnej komercjalizacji. Podczas dwóch trzymiesięcznych staży w firmach *FutureSynthesis* oraz *DSM Nutritional Products* Pani Katarzyna poszerzyła swoje doświadczenie o syntezę i oczyszczanie w skali preparatywnej pochodnych nukleozydów, przeprowadzanie analiz fizykochemicznych otrzymanych związków oraz wykonywanie walidacji urządzeń pomiarowych.

Podsumowując, uważam, że omawiana rozprawa stanowi starannie przemyślane i doskonale przygotowane dzieło naukowe. Wyróżnia ją wprowadzenie elementów nowatorskich, co przyczynia się do oryginalnego podejścia do badanego problemu naukowego. Niezwykle imponujące jest również szerokie spektrum przeprowadzonych badań oraz zdolność Doktorantki do rozwiązywania złożonych problemów naukowych w ramach interdyscyplinarnej tematyki. Jestem pod wrażeniem jej dogłębnej znajomości różnorodnych technik badawczych, a także jej umiejętności precyzyjnego formułowania celów pracy, hipotez i wniosków. Warto podkreślić, że praca nie tylko zachwyca pod względem treści, ale również została doskonale opracowana pod kątem językowym i redakcyjnym. Lektura jej była czystą przyjemnością. Ponadto, chciałbym podkreślić wartość naukową i poznawczą pracy, obejmującą:

1. Wybór aktualnego i innowacyjnego tematu badawczego w kontekście chorób cywilizacyjnych oraz przedstawienie oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.
2. Umiejętność precyzyjnego sformułowania celów pracy, hipotez i wniosków.
3. Samodzielność w przeprowadzeniu badań, rzetelność naukowa oraz profesjonalne wykorzystanie różnorodnych narzędzi badawczych.
4. Osiągnięcie bardzo ciekawych wyników o znaczeniu praktycznym.
5. Kompetentny wybór literatury oraz umiejętność krytycznej analizy i wykorzystania źródeł bibliograficznych w kontekście dojrzałej dyskusji naukowej.
6. Charakter pracy, który wyraźnie ukierunkowuje na rozwijanie ogólnej wiedzy teoretycznej z dziedziny chemii i jej potencjalne zastosowania w badaniach biologicznych i medycznych.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr **Katarzyny Krancewicz** pod tytułem „*Synteza, właściwości spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne tricyklicznych analogów tiopuryn o potencjalnych zastosowaniach biologicznych*” bez wątpienia spełnia wszystkie ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z obowiązującą Ustawą dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz późniejszymi zmianami w tym zakresie. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki

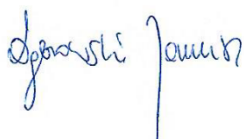
Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej**.

### Uzasadnienie wniosku

Po zapoznaniu się z treścią nadesłanego Zarządzenia nr 3/2021 Dziekana Wydziału Chemii UAM z dnia 21 czerwca 2021 roku w sprawie procedury przyznawania wyróżnienia rozpraw doktorskich na Wydziale Chemii UAM, stwierdzam, iż recenzowana praca spełnia wszystkie kryteria: i) Doktorantka ukończyła przygotowywanie pracy 4 lata od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich; ii) Doktorantka jest w współautorką co najmniej dwóch prac oryginalnych ściśle związanych z tematyką doktoratu opublikowanych w *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. Oba czasopisma znajdują się w górnych dwóch decylach (powyżej 80 %). Pierwsze czasopismo posiada współczynnik oddziaływania IF=5,6 oraz 140 punktów ministerialnych, natomiast drugie IF=4.4 i również 140 punktów ministerialnych; iii) w obu pracach Doktorantka jest pierwszą Autorką.

Moim zdaniem badania naukowe opisane w powyższych publikacjach oraz w treści rozprawy stanowią istotny wkład w rozwój chemii medycznej, fotochemii i spektroskopii molekularnej, a w szczególności w zagadnienia dotyczące projektowania, otrzymywania i charakterystyki nowych potencjalnych leków zawierających układ tiopuryny. Przeprowadzona w pracy dojrzała analiza właściwości spektroskopowych, fotochemicznych i biologicznych badanych związków została poparta wynikami otrzymanymi za pomocą szerokiej gamy metod eksperymentalnych i teoretycznych. W uzasadnieniu mojego wniosku pragnę dodać, że recenzowana dysertacja została napisana bardzo starannie poprawnym naukowo językiem polskim. Sposób przedstawienia głównych celów pracy doktorskiej oraz analiza otrzymanych wyników świadczy o samodzielności Kandydatki i Jej dojrzałości naukowej. Dodatkowo, moim zdaniem wyniki przedstawione w pracy mają istotne implikacje rozwojowe i potencjalne zastosowania praktyczne.

Łączę wyrazy szacunku,



Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ