

prof. dr hab. Janusz Rak

Gdańsk, 23 listopada 2023 roku

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Krancewicz zatytułowanej
„Synteza, właściwości spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne, tricyklicznych
analogów tiopuryn o potencjalnych zastosowaniach biologicznych”**

Tiopuryny to grupa związków o interesujących cechach fotofizycznych, charakteryzująca się właściwościami przeciwnowotworowymi, przeciwzapalnymi i immunosupresyjnymi. Podobieństwo ich budowy do natywnych nukleozydów powoduje, że związki te mogą ulegać inkorporacji do komórkowego DNA. Jeden z powszechnie używanych leków immunosupresyjnych, azatiopryna, prowadzi, po aktywacji metabolicznej, do znakowania DNA 6-tioguaniną (6-TG DNA). Tak wyznakowany DNA przyczynia się do wzrostu liczby mutacji, co stwierdzono w limfocytach pacjentów poddanych terapii azatiopryną i w konsekwencji ryzyka rozwoju białaczki. Inną, równie poważną konsekwencją obecności 6-tioguaniny w cytoplazmie, jest gromadzenie się 6-TG DNA w skórze pacjentów po transplantacjach leczonych azatiopryną. Badania kliniczne dowodzą, że w tej grupie chorych prawdopodobieństwo zachorowanie na jakąś odmianę raka skóry wzrasta 100-krotnie w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej. Obecność siarki w cząsteczce zasady nukleinowej przesunęła maksimum jej absorpcji z zakresu UVB do około 350 nm. Przy czym należy pamiętać, że frakcja A stanowi około 95% promieniowania UV docierającego do powierzchni ziemi. Wydaje się zatem, że reakcje fotochemiczne azatiopryny lub jej metabolitów są odpowiedzialne za etiologię raka skóry u pacjentów leczonych tego typu immunosupresantami. Dlatego scharakteryzowanie właściwości fotofizycznych i fotochemicznych tiopuryn wydaje się istotne z punktu widzenia zrozumienia działania badanych związków na poziomie komórki, a w konsekwencji proponowania nowych fotosensybilizatorów. Rzeczywiście, możliwość wcielania tiopuryn do DNA przez enzymatyczną maszynę komórkową oraz wrażliwość tych związków na promieniowanie elektromagnetyczne nieabsorbowane przez natywny DNA stwarza możliwość projektowania wydajnych fotosensybilizatorów uszkodzenia biopolimeru, mogących stanowić podstawę dla nowej fotodynamicznej terapii przeciwnowotworowej.

Powyższe wprowadzenie pokazuje więc, że praca doktorska mgr Katarzyny Krancewicz, opisująca syntezę, właściwości spektralne, fotofizyczne, fotochemiczne i biologiczne tricyklicznych tiopuryn, wpisuje się doskonale w aktualny nurt badań nad ważnym tak z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia problemem. Dysertacja przygotowana została w formie zwyczajowej, co już samo przez się można uważać za jej zaletę. Obecnie częściej spotyka się prace w postaci tzw. "spinki" niż klasycznego doktoratu. Ten pierwszy format sprowadza się do zbioru publikacji poprzedzonych krótkim opisem i zwykle nie pozwala na ocenę umiejętności pisania tekstów naukowych przez doktoranta. Publikacje towarzyszące pracy doktorskiej często pisane są przez innych członków zespołu autorskiego, a krótki przewodnik po publikacjach, napisany przez doktoranta, nie stanowi reprezentatywnej próby tej ważnej umiejętności dla kandydata na samodzielnego naukowca. Dysertacja liczy 202 strony, które obejmują: stronę tytułową, dedykację, podziękowania i spis treści (9 stron), wykaz stosowanych skrótów (3 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim (po 3 strony), spis osiągnięć naukowych Kandydatki (3 strony), wstęp (3 strony), część literaturową opisującą właściwości absorpcyjne, emisyjne, kwasowo-zasadowe, tautomerię prototropową, fotochemię stanów wzbudzonych oraz znaczenie biologiczne tiopuryn i tricyklicznych analogów 1,N²-eteno zasad purynowych (29 strony), cel pracy (2 stron), wyniki badań i dyskusję (99), na którą składają się cztery podrozdziały dotyczące: (i) syntezy siedmiu nowych pochodnych tricyklicznych tioguanozyny, (ii) badań *in silico* oraz *in vivo* aktywności biologicznej otrzymanych związków, (iii) badań spektralnych, fotofizycznych i fotochemicznych pochodnych 1,N²-eteno- i 1,N²-etanotioguanozyny, a także (iv) reaktywności badanych tiopuryn wobec aldehydów. Po „Wynikach i dyskusji” następuje rozdział zatytułowany „Część eksperymentalna” (30 stron), w którym podano przepisy na syntezy wraz z identyfikacją (HRMS, ¹H i ¹³C-NMR) otrzymanych pochodnych, a także opisano aparaturę i metodologię stosowaną w przeprowadzonych badaniach fotofizycznych i fotochemicznych. Rozprawę kończy rozdział „Podsumowanie i wnioski” (5 strony) oraz bibliografia (13 stron). Tekst zawierający 173 odsyłacze literaturowe i 32 tabele zilustrowano przy pomocy 47 rysunków. Układ pracy należy do klasycznych i nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa napisana jest poprawnym językiem, dzięki czemu czyta się ją z przyjemnością. Rysunki, jak zresztą cała praca, przygotowane są na bardzo dobrym poziomie technicznym. Zwraca uwagę niewielka liczba błędów typograficznych i niezręczności językowych, co świadczy o staranności

Doktorantki. Żeby jednak nie być gołosłownym poniżej przytoczę niektóre z tych błędów/niezręczności.

- Strona 14: „W odróżnieniu od innych aromatycznych tioketonów, DTEG i DTEGuo wykazują fotostabilność pod wpływem promieniowania $\lambda = 410$ nm w obecności powietrza oraz w roztworze nasyconym argonem” – „fotostabilność pod wpływem promieniowania” nie wydaje się zbyt szczęśliwym sformułowaniem.

- Strona 30 i wielokrotnie w pozostałej części tekstu: „deprotonacja” (oraz „protonacja”) – powinno być „deprotonowanie” (oraz „protonowanie”).

- Strona 51 „dostacza” – zamiast „dostarcza”.

- Strona 58 „minigramów” – zamiast „mikrogramów”

- Strona 64 „stężenie hamujące” – poprawniej „stężenie substancji” lub, po prostu, samo słowo „stężenie”.

- Ta sama strona: „układu odśrodkowego” zamiast „układu ośrodkowego”.

- Strona 70: „Inne metody z kolei bazują na własnościach cząsteczek takich jak...” – powinno być „na właściwościach cząsteczek”.

- Strona 79: „...wraz ze wzrostem charakteru niepolarnego rozpuszczalnika...” – lepiej „...wraz ze zmniejszeniem się polarności rozpuszczalnika...”

W tym miejscu należy podkreślić, że liczba tego typu usterek jest, biorąc również pod uwagę długość tekstu, niewielka i plasuje się znacznie poniżej spotykanej w przeciętnych pracach doktorskich, przygotowanych w formie klasycznych rozpraw.

Część referatowa doktoratu stanowi sekwencję powiązanych logicznie rozdziałów. Doktorantka omówiła właściwości biologiczne wybranych tiopuryn, ich tautomerię prototropową oraz właściwości kwasowo-zasadowe, a także właściwości spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne. W kolejnym fragmencie wstępu literaturowego, w podobny do tiopuryn sposób, Kandydatka podsumowała dostępne informacje dotyczące tricyklicznych analogów, głównie 1,N²-eteno, zasad purynowych, ponieważ to tiopochodne tych ostatnich stanowią główny temat dysertacji. Literatura dotycząca zasad nukleinowych, ich nukleozydów i nukleotydów jest niezwykle obszerna. Mimo to, Doktoranta doskonale poradziła sobie z wyborem odpowiednich prac oryginalnych i przeglądowych. Sensownie ograniczyła część literaturową do tiopuryn oraz trójpięścieniowych analogów natywnych

puryn. Tak skonstruowany wstęp doskonale przygotowuje czytelnika do lektury głównej części pracy, jak również świetnie odpowiada celom dysertacji.

Część zasadniczą rozprawy (badania własne Doktorantki) rozpoczyna opis syntez wybranych tiopuryn. Doktorantka zsyntezowała siedem nieopisanych do tej pory związków: pięć pochodnych 1,N²-eteno tioguaniny oraz dwie będące pochodnymi 1,N²-etano tioguaniny. Układy te poddano badaniom chemometrycznym, mającym na celu oszacowanie ich profilu ADME i lipofilowości oraz przewidzenie ich aktywności przeciwnowotworowej, a także badaniom aktywności *in vitro* na dwóch liniach komórkowych: HeLa (komórki raka szyjki macicy) i NIH/3T3 (zdrowe komórki fibroblastów mysich). W kolejnych dwóch rozdziałach o podobnej strukturze, mgr Krancewicz omawia wyniki swoich badań fotofizycznych i fotochemicznym nad 1,N²-eteno oraz 1,N²-etano analogami tioguaniny. Rozdziały te obejmują opis właściwości spektralnych, tautomerycznych, równowag kwasowo-zasadowych, właściwości emisyjnych w roztworze ciekłym i szkliwie, charakterystyk dezaktywacji stanu T₁ w różnych warunkach oraz fotochemii ze szczególnym uwzględnieniem reaktywności fotochemicznej w obecności tlenu (możliwość generowania tlenu singletowego).

Wyniki uzyskane podczas realizacji ocenianej pracy doktorskiej zostały opublikowane w formie dwóch artykułów w uznanych czasopismach chemicznych, w których mgr Krancewicz występuje jako pierwsza autorka, co sugeruje Jej wiodącą rolę w powstaniu wspomnianych publikacji. Dyskutowane wyżej badania zostały zatem zrecenzowane przez co najmniej 4 recenzentów redakcyjnych. Rola recenzenta niniejszej pracy doktorskiej sprowadza się więc przede wszystkim do stwierdzenia zgodności przedstawionej do oceny rozprawy z wymogami ustawowymi. Ponieważ recenzent wywiązujący się właściwie z powierzonych mu zadań musi być jednak odpowiednio krytyczny, pozwolę sobie w tym miejscu sformułować kilka pytań/komentarzy, które nasunęły mi się w trakcie czytania niniejszej rozprawy:

- otrzymanie pochodnych 1,N²-etenotioguaniny rozpoczyna się syntezą 1,N²-etenoguaniny, która następnie podlega tionowaniu. Literatura przedmiotu wskazuje, że wydajność tworzenia N²,3-etenoguaniny jest większa niż izomeru 1,N² (Boryski, J. *Nucleosides Nucleotides*, **1990**, 9, 803-813). Na schemacie 6. Doktorantka pokazuje mechanizm syntezy obydwu izomerów, ale stwierdza: „W tym rozdziale omówione zostaną właściwości fotofizyczne i biologiczne 1,N²-eteno analogów guaniny i jej nukleozydu wraz z określeniem wpływu dodatkowego pierścienia na aktywność

biologiczną związku wyjściowego oraz jego właściwości fotofizyczne”, nie podając jednak przyczyny, dla której ogranicza się do izomeru 1,N². Proszę o komentarz.

- opisując badania in silico Doktorantka stosuje następujące sformułowania: „liczba wiązań rotacyjnych (RB)” i „topologiczne pole polarnej powierzchni (TPSA)”. Te określenia deskryptorów są niejasne i dlatego powinny być zdefiniowane tak, żeby czytelnik rozumiał jak obliczono ich wartości. W jaki sposób wybrano zastosowany zbiór deskryptorów? Wydaje się, że wyniki analizy istotnie od niego zależą.

- W Tabeli 9 zestawiono doświadczalne wartości logarytmu dziesiętnego ze współczynnika podziału oktanol-woda. Dlaczego nie podano odchyień standardowych? Pomiar przeprowadzono jednokrotnie? W niektórych przypadkach różnice pomiędzy wartością zmierzoną a przewidywaną są znaczne (np. dla 6TG). Oprócz wartości średniej (consensus log P_{o/w}) należałoby też zamieścić obliczoną wartość maksymalną i minimalną, co pozwoliłoby się zorientować, jaką zmienność wprowadzają stosowane modele.

- W badaniach in vitro, do oceny cytotoksyczności użyto testu luminescencyjnego firmy Promega (CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay). Wcześniej zastosowano test kolorymetryczny z użyciem czerwieni neutralnej, który charakteryzował się jednak zbyt niską czułością. Dlaczego jednak nie zastosowano chyba najbardziej powszechnego testu na cytotoksyczność, a mianowicie testu MTT?

- Z danych literaturowych wynika (o czym pisze sama Doktorantka), że tiopuryny charakteryzują się aktywnością przeciwnowotworową wobec białaczek. Natomiast badania cytotoksyczności wykonano na linii HeLa, odpowiadającej rakowi szyjki ludzkiej macicy. Dlaczego? Podobnie, dlaczego jako komórki zdrowe wybrano komórki fibroblastów mysich, a nie komórki nabłonka szyjki ludzkiej macicy?

- Na stronie 74 Doktorantka postuluje mechanizm działania badanych związków w komórce: „Grupy acetylowe, które blokują grupy hydroksylowe w cząsteczkach nukleozydów uniemożliwiają zajście procesu fosforylacji, który jest kluczowy do wbudowania związków w struktury kwasów nukleinowych.” I dalej: „Na tej podstawie sugerujemy, że cytotoksyczny mechanizm działania tricyklicznych analogów tiopuryn może opierać się na wbudowywaniu ich w struktury kwasów

nukleinowych,...”. W jaki sposób można by bardziej bezpośrednio pokazać, że trójpierścieniowe analogi tiopuryn faktycznie wbudowują się w DNA komórkowe?

- Na stronie 99 Kandydatka pisze: „Zachodzenie tego procesu (JR - chodzi o przejście międzysystemowe $S_1 \rightarrow T_1$) z tak dużą efektywnością wynika z małej różnicy energii między wzbudzonymi stanami S_1 oraz T_1 , co spowodowane jest wpływem atomu siarki na wzrost sprzężenia spinowo orbitalnego między stanami singletowymi i trypletowymi”. Ze zdania tego wynika, że sprzężenie spin-orbita jest odpowiedzialne za zmniejszenie separacji S-T oraz w konsekwencji, że różnica energii stanu singletowego i trypletowego odpowiedzialna jest za efektywność przejścia ISC. Czy tak jest rzeczywiście?

- Badając właściwości fotofizyczne 1,N²-etano pochodnych wykonano szereg obliczeń kwantowochemicznych wpływu rozpuszczalnika na energie stanu podstawowego i stanów elektronowo wzbudzonych. Dlaczego tego samego podejścia nie zastosowano w przypadku pochodnych 1,N²-eteno?

- Omawiając pomiary absorpcji przejściowej dla 1,N²-etanotiopuryn, dla których rejestrowano widmo fosforescencji, zarówno w szkliwie w temperaturze 77 K, jak i w temperaturze pokojowej, Doktorantka pisze (str. 144): „Brak obserwacji pozytywnego sygnału w przypadku DTEGuo i DTEG może wynikać z położenia regionu ich absorpcji przejściowej poza badanym zakresem spektralnym lub z małej wartości molowego współczynnika absorpcji T_1-T_n , która uniemożliwiła pomiar absorpcji przejściowej za pomocą stosowanej aparatury”. Czy próbowano zastosować metodę DFT do opisu absorpcji tryplet-tryplet? Tego typu podejście powinno pozwolić na oszacowanie zarówno zakresu spektralnego absorpcji T_1-T_n , jak i jej intensywności.

Reasumując stwierdzam, że Doktorantka w pełni zrealizowała zamierzone cele badawcze. Wymienione wyżej uwagi krytyczne i komentarze mają charakter polemiczny i nie umniejszają osiągnięć Autorki. Recenzent nie ma wątpliwości, że pracę napisała osoba znająca dogłębnie eksplorowany temat. Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób dojrzały. Pani Krancewicz wykazała się umiejętnością krytycznej oceny uzyskanych rezultatów, jak również zdolnością do formułowania uzasadnionych wniosków. W tym miejscu warto również dodać, że Kandydatka, oprócz wspomnianych wyżej publikacji, posiada w swoim dorobku pięć wystąpień na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych, kierowała projektem naukowym

finansowanym ze środków „Inicjatywa Doskonałości - Uczelnia Badawcza” UAM. Odbyła jeden krótkoterminowy staż naukowy w University of Notre Dame w USA, a także dwa staże przemysłowe w biotechnologicznych firmach w Polsce: FutureSynthesis i DSM Nutritional Products. Pani Krancewicz była również beneficjentką stypendium dla najlepszych doktorantów, a także otrzymała Nagrodę Komitetu Naukowego e-Zjazdu Zimowego Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera istotne elementy nowości naukowej i spełnia wszystkie ustawowe oraz zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Katarzyny Krancewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę opisane wyżej walory dysertacji oraz fakt spełnienia przez nią wszystkich wymogów określonych w regulaminie wyróżnienie rozpraw doktorskich obronionych na Wydziale Chemii UAM, proponuję wyróżnić niniejszą pracę doktorską w stosowny sposób. Zgodnie z zarządzeniem Dziekana Wydziału Chemii UAM z dnia 21 czerwca 2021 r., szczegółowe uzasadnienie powyższej rekomendacji dołączam do recenzji jako jej integralny załącznik.

prof. dr hab. Janusz Rak

/-/

(podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym)