

Prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Dorodna 16, 03-195 Warszawa



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

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Bronisław Marciniak

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Taras-Goślińska

Ważna rola jaką odgrywają tiopuryny w leczeniu chorób nowotworowych oraz jako leki immunosupresyjne, które poprzez osłabienie układu odpornościowego są stosowane w transplantologii w celu zapobieganiu odrzucenia przeszczepu, ale także w leczeniu chorób autoimmunologicznych nie budzi już w chwili obecnej poważniejszych wątpliwości. Obecność grupy tiokarbonylowej przesuwaa zakres absorpcji światła przez tiopuryny w kierunku dłuższych fal (niższych energii) co jest konsekwencją obniżenia energii elektronowych stanów wzbudzonych, w porównaniu do naturalnie występujących nukleozydów zawierających puryny. Z tego powodu leki oparte na tiopurynach ulegają efektywniejszej fotoaktywacji kiedy są obecne w środowisku biologicznym, co w połączeniu z bliską jedności wydajnością kwantową stanu trypletowego czyni je bardzo atrakcyjnymi we współczesnych aplikacjach onkologicznych. Z drugiej strony należy jednak pamiętać, że ich wspomniane wyżej własności fotochemiczne mogą powodować niepożądane efekty fototoksyczne. Takim przykładem może być długookresowa terapia tiopurynowa, która może spowodować nadwrażliwość skóry pacjentów na światło, co w znaczący sposób może zwiększyć ryzyko rozwoju nowotworów skóry. Kolejną, dobrze poznaną grupą leków opartych na purynach są ich tricykliczne analogi, które są wynikiem obecności dodatkowego pierścienia dołączonego do szkieletu guaninowego. Ta kolejna grupa leków oparta na tak zmodyfikowanych analogach puryn charakteryzuje się ponownie niższą toksycznością, lepszą selektywnością oraz korzystniejszymi parametrami fizykochemicznymi w porównaniu z naturalnie występującymi purynami. Połączenie tych dwóch faktów rodzi dość oczywiste pytanie, czy połączenie tych dwóch modyfikacji w strukturze puryn może prowadzić do stworzenia nowej grupy leków o jeszcze lepszych właściwościach fotofizycznych i fotochemicznych i posiadającymi jeszcze lepsze właściwości ukierunkowane na leczenie chorób nowotworowych, a jednocześnie będące mniej agresywnymi w stosunku do zdrowych i nieprzekształconych komórek. Wymaga to kompleksowego spojrzenia związanego nie tylko od strony ich aktywności biologicznej ale również z koniecznością rozwoju wiedzy dotyczącej między innymi kinetyki i mechanizmów reakcji indukowanych fotochemicznie w których biorą udział. Stanowi to poważne wyzwanie nie tylko dla biochemików, biologów i medyków zajmujących się w/w zagadnieniami ale również dla chemików, a szczególnie fotochemików.

Ogólna ocena rozprawy. W te trudne do zaprzeczenia fakty bardzo dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr Katarzyny Krancewicz, która została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej i Fotochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w

Poznaniu pod kierunkiem prof. dr. hab. Bronisława Marciniaka oraz przy istotnej pomocy dr. Katarzyny Taras-Goślińskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego. Zakres rozprawy wiąże się ściśle z tematyką badań, które były przedmiotem dużo wcześniejszych zainteresowań grupy badawczej kierowanej przez Panią prof. Grażynę Wenską jak i obecnych zainteresowań innych członków grupy badawczej w której doktorantka przygotowywała swoją rozprawę, a ogólnie związanych z poznaniem mechanizmów reakcji fotochemicznych z udziałem tioanalogów zasad purynowych. Rozprawa mgr Katarzyny Krancewicz stanowi bardzo udaną kontynuację w/w tematyki i dostarcza nowych informacji związanych między innymi z mechanizmami reakcji inicjowanych fotochemicznie z udziałem wybranych tricyklicznych tioanalogów zasad purynowych.

Tematyka rozprawy, która ma charakter interdyscyplinarny, jest bardzo aktualna, nowoczesna i o dużym aspekcie poznawczym i potencjalnie aplikacyjnym, co znalazło już potwierdzenie w opublikowanych wynikach fragmentów rozprawy w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* o stosunkowo wysokich współczynnikach oddziaływania jeśli chodzi o czasopisma chemiczne. I tak, zasadnicze fragmenty rozprawy dotyczące syntezy badanych w rozprawie związków, ich wybranych własności spektroskopowych oraz aktywności antynowotworowej zostały zawarte w artykule opublikowanym w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 5.6 za rok 2022/2023), gdzie doktorantka była pierwszym autorem (przy współudziale 4 autorów, w tym promotora oraz promotora pomocniczego rozprawy). Z kolei w drugim artykule opublikowanym w czasopiśmie *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (IF = 4.4 za rok 2022/2023) znalazły się fragmenty rozprawy związane z nietypowymi własnościami fotofizycznymi dla tego typu badanych związków w odniesieniu do ich potencjalnych zastosowań biomedycznych. Ponownie, doktorantka była wymieniona jako pierwszy ze współautorów (przy współudziale 4 autorów, w tym ponownie promotora i promotora pomocniczego rozprawy), Świadczy to wyraźnie, że wyniki uzyskane przez doktorantkę w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej stanowiły również istotny wkład w zawartość merytoryczną wspomnianych wyżej publikacji.

Zanim przejdę do szczegółowej oceny rozprawy chcę w tym miejscu podkreślić dużą staranność z jaką została przygotowana (biorąc pod uwagę jej obszerność (202 strony)) zarówno pod względem językowym jak i szaty graficznej. Układ rozprawy, który jest w zasadzie typowy dla tego typu opracowań, jest przejrzysty, a prezentacja wyników oraz ich dyskusja przedstawiona w sposób jasny, konsekwentny i logiczny. Jest to jej kolejna zaleta biorąc pod uwagę bogaty i wartościowy materiał doświadczalny zgromadzony przez doktorantkę.

Rozprawa została podzielona na 7 zasadniczych rozdziałów przedstawionych na 202 stronach, zawierających 47 rysunków, 32 tabele, 27 schematów, 25 równań oraz 173 pozycje literaturowe. Bardzo pomocne przy czytaniu rozprawy były również wspomniane wyżej dwie oryginalne publikacje współautorstwa doktorantki, które zostały wymienione w spisie Jej osiągnięć naukowych na początku rozprawy.

W realizacji postawionych celów pracy mgr Katarzyna Krancewicz wykorzystwała różnorodne techniki pomiarowe i tak w części związanej z oczyszczaniem i identyfikacją otrzymanych związków, które były przedmiotem badań doktorantki: chromatografię cienkowsarstwową, chromatografię typu „flash”, wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w skali preparatywnej, spektrometrię masową z wykorzystaniem metody elektrorozpylania (ESI-MS) oraz spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego. Z kolei w części związanej z badaniami właściwości spektralnych, fotofizycznych i

fotocemicznych związków: klasyczną spektroskopię UV-vis, spektroskopię emisyjną oraz spektroskopię czasowo-rozdzielczą w postaci nanosekundowej laserowej fotolizy błyskowej oraz metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów, a w części związanej z identyfikacją produktów stałych powstałych w wyniku fotolizy badanych związków wcześniej wspomniane już techniki, mianowicie HPLC oraz ESI-MS. Świadczy to o wszechstronnym i bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki od strony eksperymentalnej i dobrym rozeznaniu w możliwościach technik eksperymentalnych, co z dużym powodzeniem wykorzystwała w swoich badaniach.

Szczegółowa ocena rozprawy. Rozprawę otwiera rozdział „**Wstęp**”, w którym mgr Katarzyna Krancewicz wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z konsekwencjami celowych modyfikacji zasad azotowych będących pochodnymi puryny, które stanowiły podstawę przesłanek jakimi kierowała się w określeniu zakresu i celu jej rozprawy doktorskiej, a mianowicie ustalenia jak przekształcenie tioanalogów zasad purynowych w ich tricykliczne analogi, (eteno-addukty i etano-addukty) będzie miało wpływ na zmianę parametrów fizyko- i fotocemicznych, i w konsekwencji na ich zdolność do generacji tzw. aktywnych form tlenu (RFT) oraz aktywność antyproliferacyjną, co z kolei może zostać wykorzystane w zastosowaniu tej grupy związków w medycynie zarówno w celach terapeutycznych jak i diagnostycznych.

W kolejnym rozdziale „**Część literaturowa**” doktorantka wprowadza czytelnika dużo dokładniej w zagadnienia, które są związane pośrednio i bezpośrednio z tematyką jej rozprawy. W sposób bardzo zwięzły omawia właściwości absorpcyjne tiopuryn (na przykładzie 6-tioguaniny i jej nukleozydów), ich tautomerię keto-enolową, równowagę kwasowo-zasadową, charakterystyki i drogi dezaktywacji wzbudzonych stanów singletowych (S_1 i S_2) i najniższego wzbudzonego stanu trypletowego (T_1), procesów fotocemicznych w obecności tlenu jak również ich znaczenie biologiczne, głównie jako leków stosowanych w chemioterapii. Tiopuryny jak trafnie zauważa doktorantka są efektem jednej z możliwych modyfikacji pierścienia purynowego poprzez zastąpienie atomu tlenu grupy karbonylowej guaniny i jej nukleozydów atomem siarki. Drugą możliwą modyfikacją pierścienia purynowego jest dobudowanie trzeciego pierścienia i utworzenie struktury tricyklicznej. Podobnie jak dla tiopuryn, doktorantka omawia wpływ tej modyfikacji (na przykładzie 1, N^2 -etenoguaniny i jej nukleozydów) na te same właściwości spektralne, tautomerię, równowagi kwasowo-zasadowe, charakterystyki wzbudzonych stanów S_1 , S_2 i T_1 , procesy fotocemiczne oraz na znaczenie biologiczne. Co do tego fragmentu rozprawy mam komentarz i związaną z tym komentarzem uwagę do doktorantki: str.48 „*Zaobserwowano jednak, że 1- N^2 -eteno-2'-deoksyguanozyna wykazuje podatność na utlenianie przez reaktywne formy tlenu tj. zarówno rodniki hydroksylowe [103], jak i tlen singletowy [104] (Schemat 10).*” Doktorantka omawia dość dokładnie wspomniany Schemat 10 pokazując jednocześnie, że reakcje różnych RFT (w tym wypadku rodnika $\bullet\text{OH}$ i $^1\text{O}_2$) z 1- N^2 -eteno-2'-deoksyguanozyną prowadzą do całkowicie różnych produktów utleniania. Są to bardzo ważne informacje przedstawione przez doktorantkę, które jednocześnie pozwalają czytelnikowi wyrobić sobie opinię jaki jest „**state of the art**” związany z mechanizmami utleniania z udziałem RFT. Szkoda, że doktorantka nie porównała mechanizmów reakcji obu tych RFT z 6-tioguaniną (6-TG). Mimo, że do chwili obecnej nie ma doniesień literaturowych związanych z badaniami mechanizmu utleniania 6-TG przez rodniki $\bullet\text{OH}$ na drodze eksperymentalnej, to wyniki obliczeń teoretycznych pozwalają przewidzieć zarówno preferowane miejsca ataku

rodników $\bullet\text{OH}$ na tę cząsteczkę jak i produkty końcowe utleniania (L. Sandhiya i K. Senthilkumar, *Int. J. Quantum Chem.* 2017; e25544). Ciekawe byłoby porównanie wyników tej pracy (nie cytowanej przed doktorantką) z wynikami prac [71] i [72]. Z dużym zainteresowaniem przeczytałem podrozdział 2.2.4 dotyczący znaczenia biologicznego 1,N²-eteno analogów zasad purynowych, a w szczególności fragment związany z aktywnością terapeutyczną tricyklicznych zasad purynowych oraz ich rybo- i deoksyrybonukleozydów oraz źródłem ich powstawania w organizmach żywych. Ten fragment rozprawy pozwala czytelnikowi ponownie wyrobić sobie opinię jaki jest „**state of the art**” związany z tymi zagadnieniami i w związku z tym o celowości podjętych przez doktorantkę badań jak również sformułowanych przez nią celów rozprawy i zaplanowanych i wykonanych w celu ich realizacji eksperymentów.

Kolejny rozdział „**Cele pracy**” precyzuje cele badawcze rozprawy jakie chciała zrealizować doktorantka wraz z wyszczególnieniem zadań badawczych służących do ich realizacji. Osobiście bardzo szeroko sformułowany pierwszy cel pracy rozdzieliłbym na trzy, które precyzyjniej odzwierciedlałyby cele, których realizację postawiła przed sobą doktorantka oraz jednoznacznie przypisałbym poszczególne zadania badawcze do konkretnych celów rozprawy. Szkoda, że w tym miejscu rozprawy doktorantka nie podkreśliła wyraźnie jaka była motywacja podjęcia tych badań, chociaż tekst z tym związany pojawia się w różnych fragmentach rozprawy, ale przez to jest rozproszony. Wydaje mi się, że np. treść ostatniego akapitu **Wstępu** (str. 24) świetnie by się do tego nadawała.

Rozdział „**Wyniki badań i dyskusja**” stanowi najważniejszą część rozprawy, w których są przedstawione uzyskane przez doktorantkę wyniki doświadczalne z ich dyskusją wraz z odpowiednim dla każdego poruszanego zagadnienia krótkim opisem przesłanek i motywacji jakimi kierowała się stawiając przed sobą konkretne cele wraz z zakresem badań niezbędnych do ich realizacji. Odnosząc się do tego fragmentu pracy chciałbym podkreślić, że mgr Katarzyna Krancewicz zgromadziła, jak już wspomniałem wcześniej, bogaty, interesujący i wartościowy od strony poznawczej materiał, co znalazło potwierdzenie w ich opublikowaniu w czasopiśmie o randze międzynarodowej. Podczas czytania tego fragmentu rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi i komentarze: (i) synteza tricyklicznych analogów tiopuryn była kluczowa do realizacji rozprawy, ale sądząc na podstawie informacji zawartych w tekście, nie stanowiła ona wielkiego wyzwania, bo w zasadzie była oparta na metodach opisanych już wcześniej w literaturze przedmiotu. Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, że doktorantka, mimo, że nie specjalizowała się w chemii organicznej, to wszystkie syntezy przeprowadziła samodzielnie; (ii) nie mogę się wypowiedzieć i w pełni ocenić badań związanych z określeniem aktywności biologicznej, zarówno metodami *in silico* jak *in vitro* z prostej przyczyny; zagadnienia te są dalekie od moich zainteresowań badawczych. Z tego powodu nie mogą między innymi ocenić na ile wiążące są wnioski uzyskane przez doktorantkę przy wykorzystaniu programów SwissADME oraz PASS, które były podstawą do kontynuacji badań aktywności biologicznej metodami *in vitro*; (iii) na str. 96 doktorantka używa terminu „krótszy czas życia stanu trypletowego”, czy ma na myśli czas życia stanu trypletowego niezależny od stężenia TEGuo i 6MeTEGuo τ^0_T czy τ_T ? Z Rysunku 17 i Tabeli 14 stała szybkości zaniku stanu trypletowego niezależna od stężenia TEGuo i 6MeTEGuo (k_0) jest wyższa w wodzie w porównaniu z acetonitrylem (ACN) i w konsekwencji τ^0_T jest rzeczywiście krótszy w wodzie w porównaniu z ACN, ale już stała

szybkości zaniku stanu trypletowego zależna od stężenia TEGuo i 6MeTEGuo (k_{sq}) jest wyższa w ACN niż w wodzie; (iv) str. 103 i 104: stałe szybkości wygaszania stanu trypletowego badanych związków przez O_2 zostały wyznaczone tylko dla jednego stężenia tlenu wynikającego z jego obecności w powietrzu; a więc ich wartości są obarczone sporym błędem, w tej sytuacji wydaje mi się nieuzasadnione podawanie wartości stałych szybkości z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku (Tabela 16 i 17); dlaczego doktorantka nie przeprowadziła pomiarów chociaż dla jeszcze jednego stężenia tlenu poprzez nasycenie roztworów czystym tlenem?(v) Schemat 23 sugeruje, że reakcją rodnika $-S^{\bullet} \rightarrow SOO^{\bullet}$ jest reakcją nieodwracalną, co jest niezgodne z danymi literaturowymi (vide Tamba et al. *Int. J. Radiat. Biol.* 1986, 50, 595-600). Oba te rodniki znajdują się w równowadze, o której położeniu decyduje stężenie tlenu w układzie. Konsekwencją tego może być obecność dodatkowego kanału reakcji, a mianowicie potencjalnie możliwej dimeryzacji dwóch rodników $-S^{\bullet}$ prowadzącej do odpowiedniego disiarczku jako produktu końcowego. Oczekuję komentarza doktorantki w tej sprawie, (vi) mechanizm fotochemicznego utleniania związków z grupą tioketonową przez tlen singletowy (1O_2) zaproponowany przez Ramamurthy'ego i współprac. w latach 80-tych ubiegłego wieku został zaakceptowany przez badaczy i opisany w licznych pracach przeglądowych i książkach o tematyce fotochemicznej. Szkoda, że przy omawianiu mechanizmów reakcji 1O_2 z badanymi przez doktorantkę związkami, a które w swojej strukturze posiadają grupę tioketonową, nie znalazł się odnośnik do chociaż jednej z prac tej grupy odnoszącej się do tego zagadnienia, a przy okazji również do pracy (nie cytowanej przez doktorantkę) zawierającej nową propozycję mechanizmu tworzenia się sulfin we wspomnianej wyżej reakcji (A.J. Sanchez-Arroyo et al. *Journal of Organic Chemistry* 2015, 80, 10575-10584), (vii) pomimo stwierdzonego długiego czasu życia stanu trypletowego T_1 1,N²-etenotiopuryn co umożliwia generowanie z dużą wydajnością tlenu singletowego (1O_2) oraz poczynionej obserwacji, że ich stany trypletowe nie są wygaszane przez nukleozydy purynowe i pirymidynowe co czyni je obiecującymi związkami w fotodynamicznej fototerapii, brakuje jednak informacji na temat samej reaktywności tlenu singletowego (1O_2) z badanymi związkami. Nie jest to zarzut, bo jak już dwukrotnie wspomniałem wcześniej doktorantka zgromadziła bardzo bogaty, interesujący i wartościowy od strony poznawczej materiał. Zagadnienie to może stanowić przedmiot przyszłych badań doktorantki. Informacje dotyczące reaktywności tlenu singletowego (1O_2) z wybranymi tiozasadami na bazie puryn i pirymidyn można znaleźć w stosunkowo niedawno opublikowanej pracy w *Chinese Journal of Chemistry* 2019, 32, 93-98.

Na ostatnie trzy rozdziały rozprawy składa się Część eksperymentalna, Podsumowanie i wnioski oraz Literatura

Rozdział „**Część eksperymentalna**” zawiera opis warunków syntezy i identyfikacji badanych w rozprawie związków oraz wielu metod i technik badawczych, które mgr Katarzyna Krancewicz wykorzystwała w swoich zadaniach badawczych, i które w większości wykonywała w swoim macierzystej instytucji (UAM w Poznaniu). Miesięczny staż naukowy w Notre Dame Radiation Laboratory (NDRL) w Stanach Zjednoczonych (pracując pod opieką dr. Gordona L. Huga) umożliwił doktorantce scharakteryzowanie stanów trypletowych T_1 tricyklicznych analogów tiopuryn w rozpuszczalnikach o różnej polarności. Na podkreślenie zasługuje trafność w wyborze obiektów badań oraz metod i narzędzi badawczych. Podczas czytania tego fragmentu rozprawy nasunęły mi się jednak

następujące krytyczne uwagi i komentarze: (i) szkoda, że doktorantka przy opisywaniu aparatury, którą wykorzystywała w pomiarach absorpcji przejściowej techniką czasowo-rozdzielczą jako jest laserowa fotoliza błyskowa nie umieściła schematu stosowanego układu do laserowej fotolizy błyskowej, a jedynie odesłała do pozycji literaturowej [172]. Nawiasem mówiąc wspomniana pozycja literaturowa dotyczy szczegółów układu pomiarowego laserowej fotolizy błyskowej z rozdzielczością nanosekundową na Wydziale Chemii UAM. Z informacji zawartej na str. 20, doktorantka korzystała również z układu do laserowej fotolizy błyskowej z rozdzielczością nanosekundową w NDRL, o czym wspominałem powyżej, który jeśli chodzi o zasadę działania i ogólną budowę, jest identyczny z układem działającym na UAM, ale już parametry najbardziej kluczowych jego części składowych jak rodzaj i moc stosowanego lasera, moc stosowanej lampy będącej źródłem światła analitycznego, rodzaj fotopowielacza, monochromatora, oscyloskopu i innych parametrów jak długość drogi optycznej, objętość naczynka pomiarowego, liczba stosowanych impulsów lasera do uzyskania rozsądnego stosunku sygnału do szumu, zakres pomiarowy widm absorpcyjnych, już niekoniecznie! Z tego powodu nie wiadomo, które pomiary opisane w podpodrozdziałach podrozdziału 5.2.6.2 realizowano na układzie w UAM, a które w NDRL. Szkoda też, że w rozprawie doktorskiej doktorantka nie opisała krótko podstaw wykorzystanej przez nią spektroskopii czasowo – rozdzielczej absorpcji przejściowej (laserowa fotoliza błyskowa) czy czasowo-rozdzielczej spektroskopii fluorescencji (zliczanie pojedynczych fotonów skorelowanych czasowo) z podaniem odpowiednich odnośników literaturowych.

Mam również kilka uwag krytycznych dotyczących stosowanych terminów w tym podrozdziale: (i) *pomiary nanosekundowej absorpcji przejściowej* (str. 175) - tytuł tego podrozdziału powinien raczej brzmieć: pomiary absorpcji przejściowej w nanosekundowej domenie czasowej, (ii) *nanosekundowy spektrometr absorpcji przejściowej* (str.175)?; nie rozumiem dlaczego w tym miejscu doktorantka zastosowała taki dziwny termin, tym bardziej, że na tej samej stronie użyła już prawidłowej nazwy stosowanej techniki badawczej, nanosekundowa laserowa fotoliza błyskowa; chociaż lepszym terminem byłoby pewnie użycie terminu: laserowa fotoliza błyskowa z rozdzielczością nanosekundową. W obecnej wersji sugeruje to czytelnikowi, że są to dwie różne techniki badawcze.

Z kolei, przy wyznaczaniu parametrów fotofizycznych charakteryzujących najniższy wzbudzony stan trypletowy (T_1) doktorantka wykorzystuje szereg równań: (15) – (22) (str. 176 – 178). Oczekiwałbym, że doktorantka poda odpowiedni odnośnik lub odnośniki literaturowe, które są źródłem tych równań. Nasuwa mi się w tym miejscu dobrze znana fotochemikom monografia „*Handbook of photochemistry*”, której autorami są Steven L. Murov, Ian Carmichael i Gordon L. Hug.

Rozdział **Podsumowanie i wnioski** stanowi właściwie końcowy rozdział rozprawy. Wnioski zostały sformułowane w sposób poprawny, chociaż niektóre fragmenty mogłyby być przedstawione w sposób bardziej zwięzły. Biorąc pod uwagę tytuł tego rozdziału powinna być odwrócona kolejność prezentacji, a więc najpierw podsumowanie a potem wnioski. Nie wydaje mi się też potrzebne zamieszczenie w tym rozdziale Rysunków 46 i 47. Są one bardzo ważne i potrzebne, ale osobiście uważam, że powinny znaleźć się na końcu Rozdziału 4.3 na str. 146.

Rozdział **Literatura** obejmuje spis cytowanych oryginalnych i przeglądowych prac, i monografii w rozprawie. Liczba i trafny dobór cytowanej literatury (uwzględniający

również ostatnie lata) świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu doktorantki w literaturze związanej z zagadnieniami zawartymi w rozprawie, poza kilkoma przeoczeniami.

Za szczególnie ważne wyniki uzyskane przez doktorantkę w trakcie realizacji rozprawy uważam:

- po raz pierwszy, kompleksowe zbadanie właściwości absorpcyjnych i emisyjnych tricyklicznych analogów tiopuryn co pozwoliło na wyciągnięcie następujących wniosków:
 - za najintensywniejsze pasmo absorpcyjne obserwowane w 1,N²-etenotioguanozynie i jej analogach jest odpowiedzialne przejście elektronowe S₀ → S₂ typu π → π*. Tylko dla acetylowanej pochodnej 9-tio-1,N²-etenoguanozyny w CCl₄ zaobserwowano w długofalowej części widma słabo intensywne pasmo absorpcji, które przypisano przejściu elektronowemu S₀ → S₁ typu n → π*. Fakt ten tłumaczy doktorantka, w oparciu o dane literaturowe, hipsochromowemu przesunięciu pasma absorpcji towarzyszącemu przejściu S₀ → S₁ wraz ze wzrostem polarnośći rozpuszczalnika i ukryciem go pod bardzo intensywnym pasmem absorpcji towarzyszącemu przejściu S₀ → S₂,
 - w oparciu o wyznaczone wartości pK_a równowag kwasowo-zasadowych blisko 95% cząsteczek analogów 1,N²-etenotiopuryn występuje w pH fizjologicznym w formie neutralnej,
 - analogi 1,N²-etenotiopuryn fluoryzują ze stanu S₂, a analogi 1,N²-etanotiopuryn z dwóch stanów S₂/S₁ z niskimi wydajnościami kwantowymi odpowiednio: ~10⁻³ i 10⁻³/10⁻⁴ - 10⁻³, co świadczy, że dezaktywacja ich wzbudzonych elektronowo stanów singletowych zachodzi głównie na drodze przejść bezpromienistych, głównie przejścia międzysystemowego do stanu T₁.
 - długi czas życia stanu T₁ dla 1,N²-etenotiopuryn umożliwia wydajne przeniesienie energii na cząsteczkę tlenu (³O₂) co prowadzi do generowania z dużą wydajnością tlenu singletowego (¹O₂), w przeciwieństwie do 1,N²-etanotiopuryn, ze względu na bardzo krótki czas życia ich stanu T₁.
 - stany trypletowe eteno analogów tiopuryn, w przeciwieństwie do tiopuryn, nie są wygaszane przez nukleozydy purynowe i pirymidynowe, co wskazuje na możliwość zastosowania tej grupy związków jako fotosensybilizatorów w terapii fotodynamicznej.

Z obowiązku recenzenta muszę również wymienić znalezione w tekście nieliczne drobne uchybienia związane m. in. z drobnymi błędami typu „*typo*” oraz z niefortunnymi terminami i sformułowaniami (niektóre zostały wymienione już wcześniej), które oczywiście nie mają istotnego wpływu na merytoryczną bardzo wysoką ocenę rozprawy: **str.78:** dlaczego w zdaniu powyżej Rys. 5 doktorantka odnosząc się do tego samego parametru (ε) używa początkowo dwukrotnie terminu „intensywność absorpcji” a pod koniec zdania prawidłowego już terminu „molowy współczynnik absorpcji”? **str 94:** „...od **błysku** lasera...” i „...**zastosowano długość fali z uprzednio zarejestrowanego widma**” (?); **str 97:** w stopce pod Tabelą 14 k_p jest zdefiniowane jako stała szybkości procesów radiacyjnych, a na str. 12 jako stała szybkości fosforescencji; **str.104 i 105:** sformułowanie **sensybilizacja tlenu singletowego** jest nie tylko nieprecyzyjne ale również wprowadzające w błąd; lepsze wydaje mi się użycie sformułowania *fotosensybilizowana generacja tlenu singletowego*, co znacznie precyzyjniej oddaje istotę procesu, polegającym na przekazaniu energii ze wzbudzonego stanu fotosensybilizatora do cząsteczki tlenu w stanie trypletowym (³O₂); **str.124:** na schemacie 23 nad strzałką pomiędzy rodnikiem -S• a -SOO•, powinna być umieszczona cząsteczka tlenu ³O₂; **str. 105:** „Energia stanu trypletowego T₁ (E_T) 6TG oraz 6TdGuo jest o ok. **1 600 cm⁻¹** wyższa

niż energia stanu $T_{1...}$; jest to spory skrót myślowy bo energii nie mierzymy przecież w tych jednostkach.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Katarzyny Krancewicz zawiera oryginalne i cenne wyniki związane z badaniami aktywności biologicznej oraz właściwości spektralnych i fotofizycznych tricyklicznych analogów tiopuryn, a ponadto reakcji wybranych tiopuryn z aldehydami, które prowadzą do ich odpowiednich tricyklicznych analogów. Doktorantka umiejętnie stawiała i rozwiązywała trudne niekiedy zagadnienia związane z zaprojektowaniem odpowiedniego układu chemicznego oraz wykazała umiejętność późniejszej interpretacji otrzymanych wyników. Ostrożność i krytycyzm doktorantki przy interpretacji i wyciąganiu wniosków świadczy o jej dojrzałości naukowej. W zasadzie, wszystkie postawione przez mgr Katarzynę Krancewicz cele badawcze rozprawy zostały przez nią zrealizowane. Jestem przekonany, że doktorantka nie tylko przygotowała bardzo wartościową rozprawę, ale przy tej okazji zdobyła dużą wiedzę związaną z inicjowanymi fotochemicznie procesami zachodzącymi z udziałem ważnych zarówno od strony biologicznej jak i medycznej cząsteczek jakimi są tricykliczne analogi tiopuryn.

Powyższe stwierdzenia upoważniają mnie do sformułowania końcowej opinii, że **rozprawa doktorska mgr Katarzyny Krancewicz spełnia całkowicie wymagania przewidziane Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. nr 65, poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami i wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Wydziału oraz dopuszczenie mgr Katarzyny Krancewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy oraz spełnienie wymagań §2 Zarządzenia nr 3/2021 Dziekana Wydziału Chemii UAM z dnia 21 czerwca 2021 roku w sprawie procedury wyróżniania rozpraw doktorskich wnioskuję o jej wyróżnienie (załącznik).**



(prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski)

Warszawa, 27 listopada 2023

Prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Dorodna 16, 03-195 Warszawa



**Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr KATARZYNY KRANCEWICZ
„Synteza, właściwości spektralne, fotofizyczne i fotochemiczne tricyklicznych
analogów tiopuryn o potencjalnych zastosowaniach biologicznych”**

Uzasadnienie

W ocenie recenzenta rozprawa mgr Katarzyny Krancewicz dostarcza nowych i cennych informacji związanych przede wszystkim z mechanizmami reakcji inicjowanych fotochemicznie z udziałem wybranych tricyklicznych tioanalogów zasad purynowych. Doktorantka po raz pierwszy, w sposób kompleksowy zbadała właściwości absorpcyjne i emisyjne tricyklicznych analogów tiopuryn co pozwoliło na wyciągnięcie wielu ważnych wniosków o dużym znaczeniu poznawczym i potencjalnie aplikacyjnym. Doktorantka jest pierwszą autorką dwóch prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 5.6 za rok 2022/2023) i *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (IF = 4.4 za rok 2022/2023). Wyróżnienie jej autorstwa pierwszą pozycją na liście autorów wskazuje na wiodącą rolę doktorantki w badaniach zespołowych, a wyniki uzyskane przez nią w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej stanowiły bardzo istotny wkład w zawartość merytoryczną wspomnianych wyżej publikacji.

W realizacji postawionych celów pracy mgr Katarzyna Krancewicz wykorzystwała różnorodne techniki pomiarowe co świadczy o wszechstronnym i bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki od strony eksperymentalnej i dobrym rozeznaniu w możliwościach technik eksperymentalnych, co z dużym powodzeniem wykorzystwała w swoich badaniach.

Wymienione wyżej argumenty oraz spełnienie wymagań §2 Zarządzenia nr 3/2021 Dziekana Wydziału Chemii UAM z dnia 21 czerwca 2021 roku w sprawie procedury wyróżniania rozpraw doktorskich skłaniają mnie do przedstawienia wniosku o wyróżnienie rozprawy.

(prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski)

Warszawa, 27 listopada 2023