

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



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. MAGDALENY DATTA
„Pochodne purynowych zasad nukleinowych jako potencjalne związki
uwrażliwiające komórki nowotworowe na promieniowanie jonizujące ”

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Janusz Rak
Promotor pomocniczy: dr Magdalena Zdrowowicz- Żamojć

Ważna potencjalna rola jaką mogą odgrywać związki chemiczne zwiększające wrażliwość komórek nowotworowych na działanie promieniowania jonizującego w radioterapii chorób nowotworowych (tzw. radiosensybilizatory) nie budzi już w chwili obecnej poważniejszych wątpliwości. Związki te można w zasadzie podzielić na dwie grupy: tzw. mimetyki tlenu, które naśladują działanie tlenu w warunkach niedotlenienia, i do których należą m.in. nitroimidazole. Nitroimidazole były szeroko badane jako radiosensybilizatory komórek niedotlenionych, ale niestety ich skuteczność kliniczna była zwykle ograniczona przez toksyczność. Z kolei do drugiej grupy należą zmodyfikowane nukleozydy, które wykorzystując szybki metabolizm komórek nowotworowych łatwo ulegają wbudowaniu się do ich materiału genetycznego. W tym miejscu należy podkreślić, że Profesor Janusz Rak (promotor niniejszej rozprawy) oraz jego grupa badawcza są światowymi liderami, zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i bezpośrednio związanymi z nimi obliczeniami teoretycznymi, które dotyczą reakcji odpowiedzialnych za uszkodzenia DNA znakowanym elektrofilowymi zasadami nukleinowymi i inicjowanych zarówno światłem jak i promieniowaniem jonizującym. O wysokim poziomie tych badań świadczą liczne cytowania ich oryginalnych prac jak i współpraca z czołowymi ośrodkami naukowymi zajmującymi się podobnymi zagadnieniami.

Dalszy rozwój wiedzy związanej z tymi zagadnieniami wymaga kompleksowego spojrzenia nie tylko od strony wyboru zmodyfikowanych zasad azotowych i ich nukleozydów silniejszych pod względem cech uwrażliwiających na uszkodzenia inicjowane zarówno fotochemicznie i radiacyjnie, co wiąże się z koniecznością prowadzenia dalszych badań dotyczących lepszego zrozumienia mechanizmów reakcji prowadzących do ich uszkodzeń, ale również pod kątem łatwości ich fosforylacji w komórce i zaakceptowania przez ludzkie polimerazy podczas biosyntezy DNA. Stanowi to poważne wyzwanie nie tylko dla chemików zajmujących się syntezą organiczną, fotochemików oraz chemików radiacyjnych, ale również dla biochemików, biologów i medyków zajmujących się w/w zagadnieniami.

Ogólna ocena rozprawy. W te trudne do zaprzeczenia fakty bardzo dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Datta, która została wykonana w Pracowni Sensybilizatorów Biologicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Janusza Raka oraz przy istotnej pomocy dr Magdaleny Zdrowowicz-Żamojć, pełniącej rolę promotora pomocniczego. Zakres rozprawy wiąże się

ściśle z tematyką badań, które były przedmiotem wcześniejszych zainteresowań grupy badawczej kierowanej od wielu lat przez Profesora Janusza Raka, w której doktorantka przygotowała swoją rozprawę, a ogólnie związanych z poznaniem mechanizmów uszkodzeń DNA znakowanym elektrofilowymi zasadami nukleinowymi indukowanych promieniowaniem jonizującym. Badania były realizowane w ramach 2 projektów badawczych Badania Młodych Naukowców (BMN) oraz 1 projektu Ugrants-start4 w ramach Inicjatywy Doskonałości Uczelnia Badawcza (IDUB), których doktorantka była kierownikiem. Rozprawa mgr inż. Magdaleny Datta stanowi bardzo udaną kontynuację w/w tematyki i dostarcza nowych informacji związanych z w/w zagadnieniami. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest oparta na zbiorze trzech (3) związanych tematycznie oryginalnych publikacji naukowych:

Publikacja #1: **M. Datta**, A. Szczyrba, M. Zdrowowicz-Żamojć, D. Wyrzykowski, O. Ciupak, S. Demkowicz, F. Izadi, S. Denifl, J. Rak *Surprising Radiolytic Stability of 8-Thiomethyladenine in an Aqueous Solution* Journal of Physical Chemistry B **2024**, 128, 3621-3628 (IF = 2.9)

Publikacja #2: **M. Datta**, A. Szczyrba, A. Czaja, M. Zdrowowicz, S. Demkowicz, J. Rak *Substituted benzylamino-2-deoxyadenosine a modified nucleoside with radiosensitizing properties* Scientific Reports **2025**, 15, 17535 (IF = 3.9)

Publikacja #3 **M. Datta**, A. Szczyrba, P. Nowak, M. Zdrowowicz, M. Rychłowski, S. S. Demkowicz, A. Sikorski, J. Rak *8-(4-Trifluoromethylthio)benzylamino-2'-deoxyadenosine: a purine nucleoside as a potential radiosensitizer* European Journal of Medicinal Chemistry 2025, 299, 118094 (IF = 5.9)

i poprzedzającym je liczącym 63 strony autoreferacie, w którym omówiono najważniejsze wyniki badawcze uzyskane przed doktorantką, które zostały przedstawione w w/w publikacjach oraz dane nieopublikowane z wykonanych przez doktorantkę badań. Taka forma przygotowania rozprawy doktorskiej jest zgodna z art. 187 pkt. 2 *Prawo o szkolnictwie wyższym*. Po załączonych publikacjach dołączone są oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu merytorycznego w w/w publikacje, na podstawie których i fakcie, że we wszystkich publikacjach doktorantka była pierwszym autorem, można stwierdzić, że wyniki uzyskane przez doktorantkę w trakcie realizacji rozprawy stanowiły istotny wkład zarówno w ich zawartość jak i jakość merytoryczną.

Tematyka rozprawy, która ma bez wątpienia charakter interdyscyplinarny, jest bardzo aktualna, nowoczesna, o dużym aspekcie poznawczym ale również istotna z punktu widzenia potencjalnych zastosowań farmakologicznych zmodyfikowanych nukleozydów w radioterapii chorób nowotworowych. Fakt, ten znalazł już potwierdzenie w trzech w/w artykułach, których zawartość merytoryczna stanowi istotne fragmenty rozprawy oraz w dwóch zgłoszeniach patentowych, które dotyczą syntezy dwóch związków wykorzystanych w realizacji rozprawy i które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako radiosensybilizatory.

W realizacji postawionych celów rozprawy mgr inż. Magdalena Datta wykorzystwała różnorodne techniki analityczne, i tak w części związanej z syntezą i identyfikacją otrzymanych pochodnych purynowych: chromatografię typu „flash”, preparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową (prep-HPLC), wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR), wysokorozdzielczą spektrometrię mas (HRMS), a w części związanej z radiolizą

roztworów pochodnych purynowych wykorzystujących radiolizę stacjonarną z użyciem promieniowania rentgenowskiego: wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią masową (LC-MS). Z kolei w części związanej z badaniami *in vitro* pochodnych purynowych, doktorantka wykonała również badania cytotoksyczności z wykorzystaniem testu MTT oraz analizę klonogeniczności wykorzystując test klonogeny umożliwiające ocenę uwrażliwienia komórek na promieniowanie jonizujące na poziomie komórkowym. Inne ważne pomiary to: analiza fosforylacji histonu H2A.X wykorzystując cytometrię przepływową oraz analizę immunofluorescencyjną, co pozwala na określenie stopnia uszkodzenia DNA. Świadczy to o wszechstronnym i bardzo dobrym przygotowaniu doktorantki od strony eksperymentalnej i jednocześnie o jej dobrym rozeznaniu w możliwościach poszczególnych technik eksperymentalnych, co z dużym powodzeniem wykorzystała w swoich badaniach.

Szczegółowa ocena rozprawy. Rozprawę otwiera sekcja „**Wykaz stosowanych skrótów**”, który jest bardzo pomocny podczas czytania rozprawy, bo bardzo szybko wyjaśnia znaczenie poszczególnych skrótów używanych przez doktorantkę w autoreferacie oraz streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim.

Merytoryczną część autoreferatu otwiera „**I. Wstęp**”, w którym mgr inż. Magdalena Datta definiuje termin „radioterapia” i wprowadza czytelnika bardzo krótko w jej podstawy i związane z nią mechanizmy oddziaływania promieniowania jonizującego na komórki nowotworowe, w szczególności w warunkach hipoksji. Ze zrozumiałych względów doktorantka skupiła się na jednej z metod stosowanych w radioterapii a mianowicie wykorzystania radiosensybilizatorów opartych na zmodyfikowanych zasadach nukleinowych i ich nukleozydach, w których rozwój bardzo duży wkład wniosły, jak wspominałem już wcześniej, badania zespołu badawczego kierowanego przez prof. Raka.

Mam kilka uwag krytycznych co do niektórych fragmentów tego rozdziału: (i) Fragment nad Rys.1 (str.12): „*Korpuskularne promieniowania jonizujące (np. wiązka cząstek α lub neutronów).... w wyniku czego dochodzi do jonizacji cząsteczek takich jak DNA*”. Neutrony nie powodują bezpośrednio jonizacji atomów ośrodka (nie są więc promieniowaniem jonizującym!!!), ponieważ oddziałują one bezpośrednio z jądrami atomów ośrodka w wyniku zderzeń sprężystych i niesprężystych, wychwyt przez jądro atomowe i reakcje jądrowe. W zależności od typu oddziaływania emitowane są albo fotony γ albo protony lub cząstki α , które w efekcie końcowym mogą dopiero prowadzić do jonizacji atomów ośrodka. (ii) Fragment na str. 12: „... *wytwarzaniu reaktywnych indywiduów - wolnych rodników, pochodzących z procesu jonizacji lub radiolizy cząsteczek wody...*” Jonizacja wody jest pierwszym etapem radiolizy wody (tzw. etap fizyczny), a dopiero potem w wyniku reakcji wtórnych powstają rodniki, jonorodniki i produkty trwałe (tzw. etap chemiczny). (iii) Uwaga co do treści zdania na str.12/13 autoreferatu: „*Radioliza wody skutkuje powstaniem szeregu reaktywnych produktów.....oraz reaktywnych form tlenu (ROS, ang. Reactive Oxygen Species)*”; reaktywne formy tlenu (RFT) jest terminem dość szerokim, z tego powodu, stwierdzenie, że radioliza wody prowadzi do ich powstania jest nie do końca prawdziwe. Radioliza czystej wody w warunkach anaerobowych prowadzi jedynie do powstania rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$) i nadtlenu wodoru (H_2O_2), które są zaliczane do RFT, a w warunkach aerobowych dodatkowo do anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$). (iv) poza

omówieniem roli radiosensybilizatorów w leczeniu onkologicznym mogła doktorantka chociaż krótko wspomnieć o istnieniu innej bardzo obiecującej metody jaką jest radioterapia FLASH, w której stosowane są z kolei bardzo wysokie moce dawek promieniowania, co najmniej 100 razy większe w porównaniu z radioterapią konwencjonalną, (v) z kolei, podsumowując podrozdział 5. *Modyfikowane nukleozydy jako potencjalne radiouczulacze* uważam, że zabrakło w tym miejscu trochę głębszego omówienia reakcji przyłączenia e^-_{aq} do zmodyfikowanych zasad purynowych oraz ich nukleozydów biorąc pod uwagę jej wieloaspektowy charakter, co jest ściśle powiązane z uszkodzeniami DNA. Przykładowo, dysocjacyjne przyłączanie elektronu do 8-Br-dA i 8-Br-dG prowadzące do Br^- i Pu^* skutkuje dwoma różnymi typami rodnika w pozycji C8 (typu- σ dla 8-Br-dA) i zdelokalizowany typu π dla 8-Br-dG), a sama reakcja może przebiegać w zależności od podstawników według 3 mechanizmów: (i) dysocjacyjne przyłączenie elektronu (DEA), (ii) sekwencyjne przeniesienie elektronu-przeniesienie protonu (ET-PT) i (iii) skoordynowane przeniesienie elektronu i protonu (EPT). Wiele tego typu informacji jest zawarte w publikacjach, które wymieniłem na końcu omawiania rozdziału *II. Cele pracy*, ale również w publikacjach cytowanych przez doktorantkę. Pozwoliłoby to czytelnikowi jeszcze lepiej wyrobić sobie opinię jaki jest „**state of the art**” związany z tymi zagadnieniami i w związku z tym o trafności podjętych przez doktorantkę badań.

Kolejny rozdział „*II. Cele pracy*” precyzuje główny cel badawczy rozprawy jaki chciała zrealizować doktorantka, a mianowicie zaprojektowanie, synteza oraz kompleksowe zbadanie właściwości nowych pochodnych zasad purynowych jako potencjalnych radiosensybilizatorów uwrażliwiających komórki nowotworowe na działanie promieniowania jonizującego. Do realizacji tego celu doktorantka postawiła przed sobą trzy zasadnicze zadania badawcze: (i) syntezę dwóch wybranych pochodnych adeniny i trzech wybranych pochodnych 2'-deoksyadenozyny, (ii) zbadanie ich możliwości na degradację indukowaną elektronem uwodnionym (e^-_{aq}) w warunkach radiolizy stacjonarnej w oparciu o produkty ich radiolizy w roztworach wodnych, (iii) weryfikację właściwości radiosensybilizujących otrzymanych pochodnych 2'-deoksyadenozyny na promieniowanie jonizujące względem dwóch linii komórek nowotworowych, nowotworu prostaty (PC3) i nowotworu piersi (MCF-7). Dobór związków do badań przez doktorantkę nie był przypadkowy. Jak sama stwierdza, w literaturze opisano tylko nieliczne przykłady pochodnych zasad purynowych, głównie analogów halogenowych 2'-deoksyadenozyny, w aspekcie zastosowania ich w radioterapii, a ponadto wcześniejsze obliczenia kwantowo-mechaniczne zmodyfikowanych zasad purynowych (wykonanych w grupie prof. Raka) wyraźnie wskazywały na obiecujące właściwości tych związków w aspekcie dysocjacyjnego charakteru przyłączenia e^-_{aq} . W tym miejscu, doktorantka cytuje tylko 3 odnośniki literaturowe [44,49,50] i odnoszące się tylko do wcześniejszych prac teoretycznych grupy prof. Raka. Z kolei zupełnie pomija odniesienie się do prac związanych z badaniami eksperymentalnymi halogenowych analogów zasad purynowych (głównie bromowych), z których część została wykonana również w grupie prof. Raka a część przez inne grupy badawcze. Co prawda, niektóre z nich znalazły się w odnośnikach literaturowych publikacji #1 – #3, ale według mnie zabrakło w obu przypadkach kilka ważnych odnośników: Chatgililoglu C. et al. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3839-3848, Chem. Eur. J. 2004, 10, 1249-1255, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 13796-13805, Ioele, M. et al. J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 1900-1907, Kaloudis P. et al. J. Phys. Chem. B

2008, 112, 5209-5217, które poza wynikami eksperymentalnymi zawierają również związane z nimi obliczenia teoretyczne.

Kolejny rozdział „**III.Badania własne**” wraz z rozdziałami „**IV.Podsumowanie**” i „**VII. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**” stanowią najważniejszą część rozprawy, w których są przedstawione uzyskane przez doktorantkę wyniki doświadczalne oraz ich dyskusja odpowiadająca poszczególnym zadaniom badawczym rozprawy, ich podsumowanie oraz ściśle z nimi związany rozdział „**VIII.Oświadczenia współautorów publikacji**” informujące o ich wkładzie w w/w publikacje potwierdzające znaczenie badań wykonanych samodzielnie przez doktorantkę.

Doktorantka rozpoczęła realizację tej części rozprawy od syntezy dwóch pochodnych adeniny; 8-metylotioadeniny (ASCH₃) i 8-trifluorometylotioadeniny (ASCF₃) wykorzystując najczęściej wykorzystywaną metodę funkcjonalizacji pozycji C8 pierścienia purynowego przez bromowanie. Schematy syntez obu tych związków zostały zamieszczone na Rys.3 (autoreferat) a dla pochodnej ASCH₃ na Rys.1 (publikacja #1), a ich identyfikacja została potwierdzona widmami ¹H NMR i HRMS (Rys.4 (autoreferat) a dla pochodnej ASCH₃ na Rys.S3 i S4 (SI dla publikacji #1).

Otrzymane związki doktorantka poddała następnie radiolizie stacjonarnej, głównie w roztworach wodnych. Dobrane parametry roztworów napromieniowanych (stężenie ASCH₃/ASCF₃, stężenie t-BuOH, stężenie buforu fosforanowego, środowisko anaerobowe oraz pH roztworu) były dobrane prawidłowo, bo zapewniły że generowane radiacyjnie elektrony uwodnione blisko w 100% reagowały z obiema pochodnymi adeniny, a generowane radiacyjnie rodniki •OH były blisko w 100% zmiatane przez t-BuOH. Wybrane dość wysokie stężenie buforu fosforanowego, nie miało wpływu na wydajność elektronów uwodnionych ze względu na dość niskie stałe szybkości ich reakcji z obiema formami jonów: H₂PO₄²⁻ i HPO₄⁻. Mam tylko 4 uwagi: (i) dlaczego podano stężenie generowanych e⁻_{aq} równe 2×10^{-7} M przez zdeponowaną w roztworze dawkę 1 Gy (str.27), z odnośnikiem do ref [55]; skoro w oparciu o ich wydajność chemoradiacyjną (0.28 μM J⁻¹, taka wartość jest podana w publikacji #1) i definicję 1 Gy (1J kg⁻¹) jest ono równe 2.8×10^{-7} M?, (ii) dlaczego podane dawki różnią się między sobą w autoreferacie (500 Gy) i publikacji #1 (300Gy)?, (iii) czy przepłukiwanie roztworu argonem przez 3 minuty było wystarczające do usunięcia z niego tlenu?, (iv) dlaczego doktorantka ani w autoreferacie ani w publikacji #1 nie podała informacji jakim dozymetrem posługiwała się przy pomiarze dawki zaabsorbowanej przez badane przez nią układy?

Podczas czytania tego fragmentu autoreferatu (str.27 – 30) i publikacji #1 nasunęły mi się następujące uwagi i komentarze: (i) bardzo ciekawą obserwacją jest brak produktów degradacji ASCH₃^{•-} w roztworach wodnych, pomimo faktu, że obliczenia kwantowo-mechaniczne metodą MPW1K/6-31++G(d,p)/PCM przeprowadzone przez jednego ze współautorów publikacji #1 wskazywały, że sam proces dysocyjnego przyłączenia elektronu (DEA) do ASCH₃ (od substratów do jego produktów jest termodynamicznie korzystny, a sam proces dysocjacji powinien przebiegać z niską barierą energetyczną dysocjacji. Aby wyjaśnić ten fakt doktorantka postawiła w autoreferacie (str.28) roboczą hipotezę, że protonowanie pierwotnie utworzonego anionorodnika ASCH₃^{•-} skutecznie hamuje jego dysocjację, nie wspominając o miejscu protonowania w ASCH₃^{•-}. Z kolei, w publikacji #1 wyjaśnienie **jest nieco inne i dużo bardziej złożone**: w oparciu o pomiary potencjometryczne stwierdzono, że ASCH₃ w warunkach eksperymentalnych jest już protonowany na atomie azotu N1 ASCH₃(H⁺_{N1}) i

przyłączenie elektronu prowadzi do neutralnego rodnika i podobnie protonowanym na atomie azotu N1 $\text{ASCH}_3(\text{H}^+_{\text{N1}})^{\bullet}$. W oparciu o obliczenia kwantowo-mechaniczne, rodnik ten ulega tautomerizacji do rodnika ale tym razem protonowanym na węglu C8 $\text{ASCH}_3(\text{H}^+_{\text{C8}})^{\bullet}$. Obliczona wysoka bariera dysocjacji wiązania S-CH₃ w tym ostatnim rodniku (53.7 kcal mol⁻¹) całkowicie uniemożliwia jego dysocjację w temperaturze w której był prowadzony eksperyment. **Proszę doktorantkę podczas obrony o odniesienie się do tego komentarza.** Bardzo dobrym posunięciem doktorantki było przeprowadzenie radiolizy stacjonarnej tego związku w roztworze acetonitrylu, w którym zaobserwowano produkty związane z degradacją ASCH_3 . W tym aprotycznym rozpuszczalniku nie ma możliwości ani na protonację powstałego $\text{ASCH}_3^{\bullet-}$ w wyniku DEA, ani protonacji ASCH_3 w stanie podstawowym. (ii) trudno mi ocenić znaczenie badań drugiej pochodnej adeniny ASCF_3 opierając się tylko na autoreferacie, poza tylko stwierdzeniem faktu, że w przeciwieństwie do pochodnej ASCH_3 , radioliza tego związku w roztworach wodnych prowadzi do fragmentacji cząsteczki w wyniku procesu DEA. Potwierdzają, to zarówno wyniki analizy HPLC wodnych roztworów ASCF_3 wykonane przed i po radiolizie stacjonarnej (Rys. 8) oraz widma MS produktów radiolizy (Rys. 9). Szkoda, że doktorantka poszczególne ścieżki reakcyjne prowadzące do poszczególnych produktów podała w formie opisowej, a nie w postaci schematu złożonego z szeregu równań reakcji chemicznych. Niestety nie są znane wyniki pomiarów potencjometrycznych i nie jest wiadomo w jakiej formie jeśli chodzi o protonowanie, występuje w warunkach eksperymentalnych cząsteczka ASCF_3 . Jeśli przyjąć wyjaśnienia dla pochodnej ASCH_3 , pK_a równowagi $K = [\text{H}^+] [\text{ASCF}_3] / [\text{ASCF}_3(\text{H}^+)]$ powinno być znacznie przesunięte w kierunku niższych pH. **Proszę doktorantkę podczas obrony o odniesienie się również do tego komentarza.**

Doktorantka kontynuowała realizację rozprawy od syntezy trzech wybranych pochodnych 2'-deoksyadenozyny; 8-(4-trifluorometoksy)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny (dA-NHbenzylOCF_3), 8-(4-trifluorometylo)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny (dA-NHbenzylSCF_3) i 8-(4-trifluorometylo)benzyloamino-2'-deoksyadenozyny (dA-NHbenzylCF_3) wykorzystując metodę opisaną w ref [53] opartą na reakcji 8-bromo-2'-deoksyadenozyny z odpowiednią aminą prowadzącą do 2'-deoksyadenozyny podstawionej w pozycji C8 pierścienia purynowego. Schematy syntez wszystkich trzech związków wraz z ich identyfikacją potwierdzoną widmami ¹H NMR i HRMS zostały zamieszczone w autoreferacie odpowiednio na Rys.5 i Rys.6.; jednocześnie schemat syntez wraz z ich identyfikacją potwierdzoną widmami ¹H NMR, ¹³C NMR i HRMS zostały odpowiednio przedstawione dla (dA-NHbenzylOCF_3) na Rys.2 (publikacja #2) i na Rys. S2 – S4 (SI dla publikacji #2), a dla (dA-NHbenzylSCF_3) na Rys. 1 (publikacja #3) i na Rys. S1 – S3 (SI dla publikacji #3). Otrzymane związki doktorantka poddała następnie radiolizie stacjonarnej w roztworach wodnych zachowując te same warunki eksperymentu jak w przypadku pochodnych adeniny i również do tego fragmentu badań odnosi się moja poprzednia uwaga związana z brakiem informacji o stosowanym przez doktorantkę dozymetrze.

Podczas czytania tego fragmentu autoreferatu (str.30 – 36) i publikacji #2 i #3 mam następujące uwagi i komentarze: (i) ważną obserwacją jest fakt, że wszystkie badane pochodne 2'-deoksyadenozyny ulegają degradacji w roztworach wodnych prowadzącej do powstania w zależności od pochodnej różnych i różnej ilości produktów: dla dA-NHbenzylOCF_3 dwóch produktów: 8-amino-2'-deoksyadenozyny i 4-trifluorometoksy-

toluenu, dla dA-NHbenzylSCF₃ czterech produktów: 8-amino-2'-deoksyadenozyny, dA-NHbenzylSCF₃-HF, dA-NHbenzylSCF₃-OHF, dA-NHbenzylS-benzylNH-dA, i dla dA-NHbenzylCF₃ dwóch produktów. W tym wypadku, nie jest dla mnie do końca jasny zapis struktury pierwszego produktu [dA-NHbenzylCF₃-F] + H + t-BuOH, który później jest zdefiniowany jako kompleks dA-NHbenzylCF₂H z t-BuOH (str. 34). Podobnie nie jest do końca dla mnie zrozumiały mechanizm tworzenia drugiego produktu [dA-NHbenzylCF₃-CF₃H]...HCOOH poprzez oderwanie grupy CF₃ i atomu H od anionorodnika (str. 35). **Proszę doktorantkę podczas obrony o wyjaśnienie struktury pierwszego produktu oraz przedstawienie dokładnego schematu reakcji związanych z tworzeniem drugiego produktu.** Wszystkie powstałe produkty doktorantka zinterpretowała w oparciu o widma MS, jak również zaproponowała możliwe ścieżki reakcyjne prowadzące do ich tworzenia, co znalazło potwierdzenie w obliczeniach kwantowo-mechanicznych wykonanych przez jednego ze współautorów publikacji (#2 i #3). Szkoda, że doktorantka poszczególne ścieżki reakcyjne prowadzące do poszczególnych produktów ponownie podała w formie opisowej, a nie w postaci schematu złożonego z szeregu równań reakcji chemicznych. Umożliwiłoby to czytelnikowi znacznie lepsze uświadomienie złożoności mechanizmów prowadzących do uszkodzeń zmodyfikowanego DNA.

Ostatnim zadaniem badawczym była weryfikacja właściwości radiosensybilizujących nowo otrzymanych pochodnych 2'-deoksyadenozyny poprzez ich badania *in-vitro* na które złożyły się: analiza cytotoksyczności i analiza klonogeniczności, a w przypadku dwóch dA-NHbenzylOCF₃ i dA-NHbenzylSCF₃ dodatkowo analiza fosforylacji histonu H2A,X, która stanowi marker uszkodzeń DSB oraz analiza lokalizacji i formy obu pochodnych we wnętrzu komórki. Badania wraz z ich wynikami dla wszystkich pochodnych doktorantka przedstawiła w autoreferacie (str. 36 – 52) a dla dA-NHbenzylOCF₃ w publikacji #2 i dA-NHbenzylSCF₃ w publikacji #3. Dlaczego potencjalny radiosensybilizator nie powinien wykazywać toksyczności wobec komórek nowotworowych bez udziału promieniowania jonizującego, tylko dopiero po ekspozycji na promieniowanie (str. 36)? **Proszę doktorantkę podczas obrony o wyjaśnienie.** Nie mogę wypowiedzieć się i w pełni ocenić i docenić badań związanych z tym zadaniem badawczym z prostej przyczyny; zagadnienia te są bardzo dalekie od moich zainteresowań badawczych. Z tego powodu np. nie mogę ocenić na ile wiążące są wnioski uzyskane przez doktorantkę przy wykorzystaniu testu MTT, bo z informacji dotyczącej ograniczeń testu MTT wynika, że wynik testu niekoniecznie zależy od żywotności całej komórki ale od aktywności obecnych w niej mitochondriów. Wnioski płynące z tych badań są jednak bardzo interesujące i stanowią jednocześnie kluczowy test na ile w/w pochodne adenozyne mogą znaleźć zastosowanie w badaniach przedklinicznych w kontekście radioterapii.

Rozdział „**Podsumowanie**” stanowi podsumowanie najważniejszych wyników uzyskanych przez doktorantkę podczas realizacji rozprawy i dla niektórych wynikające z nich wnioski. Niektóre wnioski nie są do końca uzasadnione: np. pkt. 5, str. 53.

Na kolejne dwa rozdziały autoreferatu składają się „**V.Literatura**” i „**VI.Wykaz Rysunków**”.

Rozdział „**Literatura**” obejmuje spis cytowanych oryginalnych i przeglądowych prac, i monografii w autoreferacie, ale nie obejmuje prac cytowanych w dołączonych do autoreferatu publikacjach. Liczba i trafny dobór cytowanej literatury (uwzględniający również ostatnie lata) świadczy o dobrym rozeznaniu doktorantki w literaturze związanej z zagadnieniami zawartymi w rozprawie (poza wspomnianymi wyżej przeoczeniami).

Rozdział „**Wykaz Rysunków**” zawiera zestaw podpisów pod 19 rysunkami znajdującymi się w rozdziale „*III. Badania własne*” i który według recenzenta mógłby być pominięty, bez szkody dla klarowności tekstu rozprawy.

Dla formalności należy jeszcze odnotować ostatni rozdział „**IX. Dorobek naukowy**”, który podsumowuje wszystkie osiągnięcia naukowe doktorantki na które składają się poza 3 publikacjami stanowiącymi podstawę jej rozprawy doktorskiej: współautorstwo 8 publikacji w czasopiśmie recenzowanym, 2 publikacje znajdujące się na etapie recenzji oraz 2 publikacje na etapie przygotowawczym, współautorstwo 2 zgłoszeń patentowych poza 2 związanymi bezpośrednio z rozprawą doktorską, 5 komunikatów ustnych prezentowanych na konferencjach krajowych i 1 komunikatu prezentowanego na konferencji międzynarodowej oraz 15 komunikatów plakatowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych w tym 2 uzyskanych wyróżnień za ich prezentacje. Doktorantka kierowała również 3 wewnętrznymi projektami z Funduszu Badania Młodych Naukowców (2) i IDUB (1) na Wydziale Chemii UG na badania własne. Dorobek ten związany jest z 5-letnim okresem działalności naukowej doktorantki i należy go ocenić bardzo wysoko.

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

- w oparciu o badania techniką radiolizy stacjonarnej roztworów ASCH_3 w wodzie i acetonitrylu wykazanie, że w aspekcie przyszłego projektowania nowych związków, które mają pełnić rolę radiosensybilizatorów, nie wystarczy brać pod uwagę tylko ich powinowactwa elektronowego jak i łatwości zachodzenia samego procesu DEA w tych związkach, ale również możliwości ich protonowania w roztworach wodnych, co może skutecznie zahamować proces DEA,

- w oparciu o badania techniką radiolizy stacjonarnej wodnych roztworów dA-NHbenzylOCF_3 , dA-NHbenzylSCF_3 i dA-NHbenzylICF_3 wykazanie, że wszystkie badane pochodne 2'-deoksyadenozyny ulegają degradacji w wyniku DEA, a struktura i ilość utworzonych produktów zależy od rodzaju podstawnika w pozycji para w pierścieniu benzenowym pochodnej; jedynie dla (dA-NHbenzylOCF_3) i (dA-NHbenzylSCF_3) jedynym wspólnym produktem degradacji jest 8-amino-2'-deoksyadenozyna,

- w oparciu o analizę cytotoksyczności dwóch linii komórek nowotworowych i z jedną z dwóch linii komórek zdrowych stwierdzono, że najwyższą toksycznością charakteryzuje się pochodna dA-NHbenzylSCF_3 , w oparciu o analizę klonogeniczności tych samych linii komórek nowotworowych stwierdzono największe obniżenie ich żywotności ponownie dla tej samej pochodnej, i w oparciu o analizę poziomu fosforylacji histonu H2A.X, tylko ta sama pochodna w połączeniu z napromienianiem powoduje zwiększenie radiowrażliwości obu linii komórek nowotworowych,

- w oparciu o lokalizację subkomórkową pochodnych dA-NHbenzylOCF_3 , dA-NHbenzylSCF_3 , stwierdzono, że obie pochodne lokalizują się w jądrze komórkowym i cytoplazmie z dominującą lokalizacją w tej ostatniej.

Z obowiązku recenzenta muszę również wymienić znalezione w tekście autoreferatu drobne uchybienia związane m. in. z niefortunnymi lub błędnymi terminami i sformułowaniami które oczywiście nie mają istotnego wpływu na wysoką merytoryczną ocenę rozprawy: **str. 13** – ...*działanie elektronów uwodnionych ma charakter pośredni*"; co doktorantka rozumie przez to stwierdzenie?, **str. 15** – warunki „normotlenowe; czy nie jest to niezbyt fortunnie sformułowany termin odpowiadający „normoksji”?, **str. 29** –

niefortunnie sformułowane fragmenty zdań: „...pod wpływem elektronu nastąpił jego rozpad...”, „...abstrahować atom wodoru...”, **str. 32** – błędne zdanie „W tym etapie prawdopodobnie uczestniczą rodniki $\cdot t\text{-BuOH}$, które powstają podczas radiolizy i jednocześnie wychwytyją rodniki $\cdot\text{OH}$ ”; to zdanie jest błędnie sformułowane: rodniki $\cdot t\text{-BuOH}$ nie powstają podczas radiolizy tylko w wyniku wtórnej reakcji rodników $\cdot\text{OH}$ z $t\text{-BuOH}$, rodniki $\cdot t\text{-BuOH}$ nie wychwytyją rodników $\cdot\text{OH}$, rodniki $\cdot\text{OH}$ są wychwytywane przez $t\text{-BuOH}$, **str. 33** – błędne zdanie „W obecności utleniających rodników $\cdot t\text{-BuOH}$...; rodniki $\cdot t\text{-BuOH}$ nie mają własności utleniających, w aspekcie reakcji typu red-ox uważane są jako rodniki neutralne, w przeciwieństwie do rodników centrowanych na węglu powstających z metanolu, etanolu, 2-propanolu, które mają własności redukujące, **str. 40** – „...uzyskanie ujemnych...jest *niefizycznie*,...” **str. 44** – „*radiosensytywność*” → radiowrażliwość, **str. 54** – ... *aresztu komórkowego*...? **str. 55** – niefortunne sformułowanie „...są wcielone do DNA... → wbudowane/wstawione do DNA?; błędny termin: „*radiochemiczny*” → chemiczno-radiacyjny. Z kolei na str. 3623 publikacji #1 (**str. 67**) błędnie użyto nazwy stosowanego buforu podczas radiolizy roztworów wodnych „*phosphorus buffer*”, chyba chodzi tu o „*phosphate buffer*”. Jego nazwa została z kolei poprawnie użyta na **str. 27** autoreferatu.

Końcowa ocena rozprawy. Reasumując, rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Datta zawiera oryginalne i wartościowe wyniki związane z analizą produktów i z mechanizmami ich powstawania podczas radiolizy roztworów wodnych otrzymanych przez doktorantkę nowych pochodnych adeniny oraz 2'-deoksyadenozyny w aspekcie ich reakcji z elektronem uwodnionym oraz z badaniami ich aktywności biologicznej w aspekcie ich zastosowania w radioterapii jako radiosensybilizatorów.

W zasadzie, wszystkie postawione przez doktorantkę cele badawcze rozprawy zostały przez nią zrealizowane. Jestem przekonany, że doktorantka nie tylko przygotowała wartościową rozprawę, ale przy tej okazji zdobyła wiedzę związaną z procesami rodnikowymi indukowanymi promieniowaniem jonizującym zachodzącymi w wodnych roztworach zasad nukleinowych, i doświadczenie związane z prowadzeniem analiz służących do oceny ich aktywności biologicznej wraz z ich właściwą interpretacją, jak również zapoznała się z różnorodnymi technikami badawczymi.

Powyższe stwierdzenia upoważniają mnie do sformułowania końcowej opinii, że **rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Datta spełnia całkowicie wymagania przewidziane Ustawą dla doktorantów szkół doktorskich określone w art.187 ust. 1 – 3 z dnia 20 lipca 2018 wraz z późniejszymi zmianami i wnoszę o jej przyjęcie przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne oraz dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Datta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

(prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski)

Warszawa, 3 listopada 2025