



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Dr hab. Ewa Słomińska
Katedra i Zakład Biochemii
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk

TEL: +48 58 349 1464
FAX: +48 58 349 1460
email: eslom@gumed.edu.pl
www.gumed.edu.pl

Gdańsk, 10 wrzesień 2016

Dr hab. inż. Jerzy Gębicki, prof. PŁ
Dziekan Wydziału Chemicznego
Politechniki Łódzkiej

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Dawida Dębskiego** pt. „*Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbników przeznaczonych do detekcji nadtlenu wodoru i nadtlenoazotynu*”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny ze względów poznawczych, ale przede wszystkim praktycznych. Dotyczy badań nad reaktywnością próbniaka Amplex Red oraz związków boronowych względem wybranych rodników oraz określenia mechanizmów ich oksydatywnej konwersji. Jest to zagadnienie niezmiernie aktualne w świetle licznych doniesień o ciągłym poszukiwaniu nowych narzędzi do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu. W chwili obecnej nadal nie ma idealnych próbników do detekcji wybranych rodników, szczególnie tworzących się wewnątrz komórek, w tym w strukturach subkomórkowych – głównie w mitochondriach. Prezentowane w tej rozprawie wyniki są kontynuacją i rozwinięciem badań zespołu prof. Andrzeja Marcinka, promotora rozprawy oraz dr inż. Adama Sikory, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym *Free Radical Biology and Medicine*, *Pharmacological Report*, *The Journal of Biological Chemistry*, *Chemical Research in Toxicology*, których doktorant jest współautorem.

W toku prowadzonych badań doktorant wykazał, że powszechnie stosowany próbnik Amplex Red nie jest selektywnym narzędziem przeznaczonym do detekcji nadtlenu wodoru. Próbnik ten może być utleniany przez silne, jednoelektrodowe utleniacze – rodnik azydkowy, anionorodnik węglanowy, ditlenek azotu oraz nadtlenoazotyn. Z kolei rodnik glutationylowy nie jest zdolny do utleniania próbniaka Amplex Red, co więcej glutation zdolny jest do efektywnego zmiatania powstającego rodnika próbniaka i hamowania utleniania. W układach biologicznych, w których stężenie glutationu jest wysokie, możliwość detekcji nadtlenu azotu bądź nadtlenoazotynu za

pomocą próbnika Amplex Red będzie niedokładna. Doktorant dokonał badań pozwalających na kompleksowy opis spektroskopowy i kinetyczny procesu jednoelektrodowego utleniania Amplex Red. Ponadto wykazał, że obecność w badanym środowisku peroksydazy chrzanowej powoduje większą wydajność reakcji utleniania próbnika Amplex Red przez nadtlendioazotyn (brak selektywności próbnika będzie prowadził w przypadku obecności w układzie nadtlenu wodoru, nadtlendioazotynu i peroksydazy chrzanowej do przeszacowania ilości wykrytego H_2O_2).

W drugiej części rozprawy doktorant wykazał przydatność i właściwości wybranych związków boronowych jako próbników do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu. Wykazano, że reaktywność próbnika PC1 względem nadtlendioazotynu jest zależna od pH środowiska. Dodatkowo próbnik ten ulega reakcji z glutationem, co eliminuje jego wykorzystanie w układach biologicznych. Dla próbników przeznaczonych do detekcji nadtlendioazotynu w mitochondriach nie tylko zbadano ich dane kinetyczne, ale wykazano, że podstawienie w pozycji orto- pierścienia aromatycznego w tych próbnikach, różni się znacząco od izomerów w pozycji meta- i para-. Doktorant wykazał, że związki boronowe mogą być przydatne do detekcji produktu reakcji azanonu (HNO) z tlenem cząsteczkowym.

Rozprawę doktorską rozpoczyna obok *Spisu treści, Wprowadzenia, Przegląd literaturowy*, obejmujący 30 stron oraz rozdział *Metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu* (17 stron). Wydaje się, że te dwa rozdziały należy uznać za „tradycyjny” wstęp rozprawy doktorskiej. Przedstawiono w nich wyczerpujące kompendium wiedzy o najważniejszych reaktywnych formach tlenu i azotu (anionorodniku ponadtlenkowym, nadtlenu wodoru, azanonu, nadtlendioazotynu), a także o metodach ich detekcji oraz zaletach i ograniczeniach stosowanych próbników. W mojej ocenie ta część rozprawy doktorskiej napisana jest dobrze i wyczerpująco. Muszę jednak, ze względu na rolę recenzenta, zwrócić uwagę na parę drobnych błędów i nieścisłości, które znalazły się w tym fragmencie rozprawy doktorskiej. Doktorant bardzo często używa niezbyt naukowego sformułowania „reaktywne indywidua” w odniesieniu do rodników tlenu i azotu oraz nadtlenu wodoru, lepiej brzmiałoby „reaktywne formy, reaktywne cząstki”. Dla biochemika nieco rażąco jest fragment opisujący funkcjonowanie łańcucha oddechowego (str. 17): a) w błonie mitochondrialnej jest zlokalizowana dehydrogenaza NADH a nie sam NADH, b) transport protonów odbywa się do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium a nie do cytozolu, c) reakcja (2.14) tworzenia ATP jest zbyt uproszczona, nie uwzględnia bowiem ładunku i błędnie zaznaczone jest pochodzenie protonów.

Nieprecyzyjny jest także użycie w odniesieniu do izoform syntazy tlenu azotu określenia „rodzaje tego enzymu” (str.18).

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to doktorant może pochwalić się znajomością z jednej strony techniki radiolizy impulsowej czy ultrasprawnej chromatografii cieczowej, a z drugiej strony biegłością obliczeń kwantowo-mechanicznych. Opis metodyczny jest wyczerpujący i poprawny. Doktorant jednak przed opisaniem metodyki pracy nie podał jakie cele badań zostały zaplanowane, co w momencie czytania rozprawy nie pozwala na rozstrzygnięcie, czy zastosowane metody są prawidłowo dobrane. Na tę ocenę można pozwolić sobie po przeczytaniu dwóch następnych rozdziałów. W ocenie recenzenta rozdział „*Cel badań*” powinien poprzedzać rozdział „*Metodyka pracy*”.

Cele badań zostały podane w następujących dwóch rozdziałach: „*Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbnika Amplex Red*” oraz „*Wybrane aspekty reaktywności związków boronowych*”. Założone cele podjętych badań zostały w pełni zrealizowane przez doktoranta przy zastosowaniu odpowiednich i nowoczesnych metod badawczych.

Wyniki badań, zarówno ryciny jak i ich opis są przedstawione poprawnie i czytelnie. Sposób przeprowadzenia doświadczeń jest poprawny i nie nasuwa uwag krytycznych. Jednak moje zdziwienie budzi przedstawienie w tej części rozprawy wyników będących elementem pracy magisterskiej. Są prezentowane na 5 stronach (od str. 74 do 79). Dlaczego nie przedstawiono tych danych we wstępie rozprawy?

Z analizy publikacji załączonych na końcu rozprawy doktorskiej wynika, że większość uzyskanych przez doktoranta wyników została już opublikowana i to w prestiżowych czasopismach. W ocenie recenzenta jest to duże osiągnięcie doktoranta i powinno być podkreślone i wyraźnie zaznaczone przy prezentowanych wynikach.

Równocześnie z przedstawionymi rezultatami badań przeprowadzona jest dyskusja wyników. Jest ona ciekawa i dobrze napisana. Oceniając dyskusję mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez doktoranta dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w pracy problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.

Każda z dwóch części doświadczalnych kończy się podsumowaniem i wnioskami. Wnioski są prawidłowo sformułowane i w całej pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń.

Za najciekawsze i oryginalne osiągnięcia doktoranta przedstawione w recenzowanej rozprawie doktorskiej a jednocześnie niesłychanie ważne dla wszystkich badaczy oznaczających w układach biologicznych reaktywne formy tlenu i azotu uważam wykazanie, że:

- a) próbnik Amplex Red nie jest selektywnym próbikiem przeznaczonym do detekcji nadtlenu wodoru, może być utleniany oprócz H_2O_2 przez silne, jednoelektrodowe utleniacze.
- b) możliwość detekcji nadtlenu wodoru bądź nadtlenuazotynu w układach biologicznych jest ograniczona przy dużych stężeniach glutationu
- c) związki boronowe są dobrym narzędziem do detekcji nadtlenuazotynu w układach biologicznych, w tym w mitochondriach.

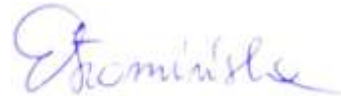
Na zakończenie jeszcze raz chciałabym podkreślić, już na tym etapie rozwoju naukowego, doskonały warsztat doświadczalny doktoranta oraz dorobek naukowy. Przedstawione na końcu rozprawy publikacje doktoranta posiadają imponujący skumulowany współczynnik oddziaływania (IF=17).

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr inż. Dawid Dębski jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami analitycznymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych. Jego rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału

Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Dawida Dębskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Dębskiego.

Z poważaniem



Dr hab. n. med. Ewa Słomińska