

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



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. DAWIDA DĘBSKIEGO
„Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbników przeznaczonych do
detekcji nadtlenu wodoru i nadtlenuazotynu”**

Istotna rola jaką odgrywają wolne rodniki w środowisku biologicznym nie budzi w chwili obecnej żadnych wątpliwości. Rodniki, jak również utleniacze o charakterze nie rodnikowym ważne z punktu widzenia biologicznego, powszechnie określane jako reaktywne formy tlenu i azotu (RFTiA), generują różnorodnego typu odpowiedzi w żywych organizmach począwszy od inicjowania procesów patologicznych (choroby neurologiczne, choroby nowotworowe, arterioskleroza, cukrzyca oraz stany zapalne) jak również procesów związanych z biologicznym starzeniem. Z jednej strony ich obecność w wysokich stężeniach (tzw. stres rodnikowy, który może być stresem zarówno oksydacyjnym jak i redukcyjnym) jest bardzo niebezpieczna i może prowadzić do uszkodzeń wszystkich głównych składników komórkowych. Z kolei w warunkach niskich stężeń te same indywidua mogą odgrywać rolę mediatorów regulacyjnych w procesach przesyłania sygnałów biochemicznych. Wiele tego typu sygnałów zabezpiecza komórki przed stresem oksydacyjnym i przywraca w nich redoksovą homeostazę. Olbrzymi postęp, jaki ma miejsce w ostatnich kilkunastu latach i który ciągle dokonuje się na naszych oczach w lepszym poznaniu procesów zachodzących z udziałem RFT i RFA zarówno *in vitro* jak *in vivo* wymaga kompleksowego spojrzenia związanego nie tylko z prawidłową ich identyfikacją zarówno od strony jakościowej jak i ilościowej, ale również z koniecznością rozwoju wiedzy dotyczącej między innymi kinetyki i mechanizmów reakcji w których biorą udział. Stanowi to poważne wyzwanie dla chemików, biofizyków, biochemików, biologów i medyków zajmujących się w/w zagadnieniami. Wymaga to między innymi opracowania nowych, bardziej precyzyjnych i wiarygodnych poprzez ich selektywność metod detekcji i identyfikacji RFT i RFA, co stanowi podstawę do opracowania i lepszego zrozumienia, między innymi, mechanizmów chorobowych w których uczestniczą.

W te trudne do zaprzeczenia fakty bardzo dobrze wpisuje się rozprawa doktorska mgr. inż. Dawida Dębskiego, która została wykonana w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Andrzeja Marcinka oraz przy istotnej pomocy, szczególnie w pierwszym okresie realizacji rozprawy, dr. inż. Adama Sikory pełniącego rolę promotora pomocniczego. Zakres rozprawy wiąże się ściśle z tematyką badań, które były przedmiotem wcześniejszych i obecnych zainteresowań promotora i promotora pomocniczego rozprawy jak również innych członków grupy badawczej w której doktorant przygotowywał swoją rozprawę i ogólnie związanych z poznaniem mechanizmów reakcji z udziałem wybranych RFT i RFA z próbnikami służącymi do ich identyfikacji. Rozprawa mgr. inż. Dawida Dębskiego stanowi bardzo udaną kontynuację w/w tematyki i dostarcza nowych informacji związanych z mechanizmami utleniania wybranych próbników służących do detekcji nadtlenu wodoru i nadtlenuazotynu.

Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna, nowoczesna i o dużym aspekcie poznawczym, co znalazło już potwierdzenie w opublikowaniu jej wyników w renomowanych czasopismach z bazy *Journal Citation Reports* o wysokich współczynnikach oddziaływania. I tak, zasadniczy fragment rozprawy dotyczący próbnika Amplex Red został w całości zawarty w artykule opublikowanym w czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine* (IF = 5.784), gdzie doktorant był pierwszym autorem (przy współdziale 9 współautorów). Z kolei w artykułach opublikowanych w czasopismach *The Journal of Biological Chemistry* (IF = 4.258) i *Chem. Res. Toxicol.* (IF = 2.36) znalazły się fragmenty rozprawy związane odpowiednio z ustaleniem charakteru utleniacza tworzącego się w wyniku reakcji azanonu z tlenem cząsteczkowym oraz z wykorzystaniem trifenylofosfoniowej pochodnej kwasu aryloboronowego do detekcji nadtlenoazotynu. W pierwszym z tych artykułów doktorant był wymieniony na drugim miejscu (przy współdziale 7 współautorów), a w drugim na czwartym miejscu (przy współdziale 9 autorów). Świadczy to wyraźnie, że wyniki uzyskane przez doktoranta w trakcie realizacji stanowiły istotny wkład w ich wartość merytoryczną. Z kolei w artykule przeglądowym opublikowanym w *Pharmacological Reports* (IF = 2.251) zawarty jest istotny fragment rozdziału rozprawy **Przeгляд literaturowy**.

Przy tak obszernie opublikowanym materiale zawartym w niniejszej rozprawie i to w renomowanych czasopismach o obiegu ogólnosiwiatowym odnoszę wrażenie, że w tym konkretnym przypadku doktorant mógł przygotować rozprawę w formie znacznie krótszej z odpowiednimi odnośnikami do artykułów związanych z tematyką rozprawy, w których jest współautorem, a które stanowiłyby załączniki do rozprawy. Odpowiednia ustawa dopuszcza taką formę rozprawy doktorskiej.

Zanim przejdę do szczegółowej oceny rozprawy chcę w tym miejscu podkreślić dużą staranność z jaką została przygotowana (biorąc pod uwagę jej obszerność (153 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 doktoranta.

Rozprawa została podzielona na 10 zasadniczych rozdziałów przedstawionych na 153 stronach, zawierających 60 rysunków, 5 tabel, 269 pozycji literaturowych oraz bardzo pomocne przy czytaniu rozprawy załączniki 4 oryginalnych publikacji doktoranta.

W realizacji postawionych celów pracy mgr inż. Dawid Dębski wykorzystał różnorodne techniki pomiarowe: radiolizę impulsową z czasowo-rozdzielczą detekcją spektrofotometryczną UV/Vis, ultra-sprawną chromatografię cieczową, spektrofotometrię UV-vis w wersji klasycznej i wersji z zatrzymanym przepływem i fluorymetrię oraz przeprowadził obliczenia kwantowo-mechaniczne dla indywiduów przejściowych tworzących się z próbnika Amplex Red. Świadczy to o wszechstronnym i bardzo dobrym przygotowaniu doktoranta od strony eksperymentalnej oraz do pewnego stopnia również od strony teoretycznej, co zresztą z powodzeniem wykorzystał w swoich badaniach.

Rozprawę otwiera rozdział „**Wprowadzenie**”, w którym mgr inż. Dawid Dębski wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z przesłankami jakimi kierował się w określeniu zakresu i celu Jego rozprawy doktorskiej, a mianowicie ustalenia mechanistycznych aspektów utleniania oraz scharakteryzowania wybranych próbników przeznaczonych do detekcji dwóch wybranych RFTiA – H_2O_2 i HOONO.

W kolejnym rozdziale „Przegląd literaturowy” doktorant wprowadza czytelnika w zagadnienia, które są związane pośrednio i bezpośrednio z tematyką Jego rozprawy, a mianowicie w sposób bardzo zwięzły podaje ogólne wiadomości o RFTiA, a następnie dużo dokładniej omawia własności chemiczne i główne źródła tworzenia czterech z nich ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HNO i $ONOO^-$). Trzy ostatnie wymienione reaktywne formy są przedmiotem rozprawy, z kolei $O_2^{\bullet-}$ jest prekursorem niektórych z nich, co w pełni uzasadnia omówienie również jego własności i pozwala na lepsze zrozumienie wzajemnych powiązań. W tym miejscu mam kilka pytań do doktoranta i komentarzy do niektórych sformułowań: (i) str. 21 „Głównym biologicznym reagentem H_2O_2 są białka zawierające reszty cysteinowe. Ponieważ reakcja nadtlenu z tiolami zachodzi ze zdeprotonowaną cząsteczką tiolu, reaktywność ta jest silnie uzależniona od pH środowiska i pK_a odpowiedniej grupy tiolowej”. Po pierwsze wartość pK_a grup $-SH$ obecnych w większości peptydów i białek występujących w cytoplazmie jest wyższa niż 8, co oznacza, że w warunkach fizjologicznych grupy te występują w postaci uprotonowanej, co czyni je nieaktywnymi w wewnątrzkomórkowym pH. Przykładem jest cysteina i glutation, których wartości pK_a wynoszą odpowiednio 8.3 i 8.8. W niektórych tylko białkach (np. w transferazie siarkowej i fosfatazie tyrozynowej) wartość pK_a grup $-SH$ jest znacznie niższa i wynosi odpowiednio 3.5 i 5.3, co jest związane z występowaniem w ich sąsiedztwie naładowanych reszt aminokwasowych histydyny, lizyny lub argininy. Po drugie, jest coraz więcej dowodów doświadczalnych na to, że ważnym biologicznym reagentem H_2O_2 są również białka zawierające metioninę, której utlenianie prowadzi do powstawania odpowiedniego sulfotlenku. (ii) (str. 25 – 31) z dużym zainteresowaniem przeczytałem podrozdziały dotyczące źródeł powstawania i chemii azanonu. Ze względu na fakt, że azanon jest formalnie produktem jedno-elektronowej redukcji NO, czy jest uzasadnione przyjęcie hipotezy, że w warunkach „*in vivo*” może być produktem w warunkach tzw. „stresu redukcyjnego”? (iii) (str. 32) „Kwas nadtlenoazotynowy ($ONOOH$) posiada pK_a równe 6.8, co sprawia, że w warunkach fizjologicznych (przy pH równym 7.4) ok 80% tej RFTiA występuje w anionowej formie $ONOO^-$, zaś około 20% w formie $ONOOH$.” Ta informacja odnosi się do kwasu $ONOOH$ występującego w formie *cis*. Forma *trans* tego kwasu charakteryzuje się $pK_a = 8.0$, co powoduje, że w warunkach fizjologicznych ten sam kwas występuje w znacznej przewadze w formie uprotonowanej. (iv) str. 37 „...poza wspomnianymi aminokwasami tiolowymi, nadtlenoazotyn reaguje też m. in. z glutationem.”. Jakie aminokwasy tiolowe ma doktorant na myśli? Wcześniej wspomniane były dwa aminokwasy, które zawierają w swojej strukturze atom siarki (cysteina i metionina), ale tylko pierwszy z nich posiada grupę boczną z grupą tiolową, gdy z kolei metionina posiada grupę boczną z grupą tioeterową. Ta sama uwaga dotyczy podpisu w Tabeli 2.3 na str. 38, gdzie raczej nie mam już wątpliwości, że doktorant do tzw. aminokwasów tiolowych zalicza niesłusznie również metioninę.

Kolejny rozdział „Metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu” ma też charakter przeglądu literaturowego, ale tym razem obejmującego zarówno stosowane metody detekcji wybranych w niniejszej rozprawie do badań RFTiA (H_2O_2 i $HOONO$) jak i wykorzystywane do tego celu próbniki spektroskopowe. Doktorant napisał ten rozdział bardzo dobrze, bo nie ograniczył się jedynie do wymienienia stosowanych metod detekcji i scharakteryzowania wykorzystywanych próbników, ale w sposób krytyczny przedstawił zarówno ich zalety jak i ograniczenia oraz omówił przyczynę popełnianych

błędów przy oznaczaniu RFTiA. Większość z nich była spowodowana niepełną znajomością mechanizmów zachodzących w tych układach reakcji, a których produkty były podstawą identyfikacji i oznaczeń ilościowych. Ten fragment rozprawy pozwala czytelnikowi wyrobić sobie opinię jaki jest „*state of the art*” związany z tymi zagadnieniami i w związku z tym o celowości podjętych przez doktoranta badań jak również sformułowanych przez niego celów rozprawy i zaplanowanych i wykonanych w celu ich realizacji eksperymentów. W zasadzie w tym fragmencie rozprawy nie znalazłem żadnych usterek, poza faktem, że na kilku rysunkach prezentujących schematy mechanizmów utleniania nie ma pełnego bilansu materiałowego. Przypuszczam, że doktorant zrobił to celowo (dla jasności schematów) i skupił się jedynie na istotnych produktach poszczególnych etapów mechanizmów reakcji.

Kolejny rozdział „**Metodyka pracy**” rozpoczyna część eksperymentalną rozprawy i zawiera kompetentny i wyważony opis wielu metod i technik badawczych, które mgr inż. Dawid Dębski wykorzystał w swoich badaniach, i które wykonywał tylko w swoim macierzystym ośrodku. Na podkreślenie zasługuje trafność w wyborze obiektów badań oraz metod i narzędzi badawczych. Szkoda tylko, że doktorant skoro zdecydował się na przygotowanie rozprawy w formie rozszerzonej, nie umieścił w podrozdziale 4.1. schematu stosowanego układu do radiolizy impulsowej, a jedynie odesłał do odpowiednich pozycji literaturowych [239 i 240], str. 65. Schemat taki znacznie ułatwiłby zrozumienie przedstawionego przez doktoranta na str. 65 i 66 jego szczegółowego opisu. Nawiasem mówiąc, wspomniane pozycje literaturowe dotyczą nie szczegółów budowy akceleratora, ale raczej szczegółów układu pomiarowego radiolizy impulsowej opartego o akcelerator ELU. Podobna uwaga dotyczy układu do pomiarów spektrofotometrycznych z zatrzymanym przepływem.

Kolejne rozdziały „**Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbnika Amplex Red**” oraz „**Wybrane aspekty reaktywności związków boronowych w kontekście ich wykorzystania do detekcji nadtlenoazotynu**” stanowią najważniejszą część rozprawy, w których są przedstawione uzyskane przez doktoranta wyniki doświadczalne z ich dyskusją wraz z odpowiednim dla każdego poruszanego zagadnienia wprowadzeniem, krótkim opisem przesłanek i motywacji jakimi kierował się stawiając przed sobą konkretne cele wraz z zakresem badań niezbędnych do ich realizacji. Odnosząc się do tego fragmentu pracy chciałbym podkreślić, że mgr inż. Dawid Dębski zgromadził, jak już wspomniałem wcześniej, bogaty, interesujący i wartościowy od strony poznawczej materiał, co znalazło potwierdzenie w ich opublikowaniu w czasopiśmie o dużej randze międzynarodowej.

Podczas czytania tych fragmentów rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi i komentarze: (i) **str. 75**: czy reakcja 5.3, ze względu na niską wartość stałej szybkości, ma możliwość konkurowania z reakcją atomu wodoru z wprowadzonymi próbnikami? (ii) **str. 76**: „*Reaktywność rodnika azydowego względem innych związków*” jest wysoka”. Jakie **inne związki** miał doktorant na myśli? Reaktywność $\cdot\text{N}_3$ nie ze wszystkimi związkami jest przecież wysoka. (iii) **str. 77**: „*W dłuższej skali czasowej.....towarzyszy powstawanie nowego pasma w zakresie 500-700 nm z maksimum przy 630 nm*” Nie jest to opis precyzyjny, bo pasmo to jest już obecne we wcześniejszych domenach czasowych. (iv) **str. 78**: w podpisach pod rys. 5.3 brak jest informacji o pH badanych roztworów. Można tylko przypuszczać, że pomiarów dokonano w tych samych pH, w których zarejestrowane widma absorpcyjne. Jeśli tak, to w oparciu o Rys. 5.6 podane

stałe szybkości reakcji $\cdot\text{N}_3$ i $\text{CO}_3^{\cdot-}$ dotyczą reakcji z dwiema różnymi formami kwasowo-zasadowymi próbnika Amplex Red. Czy doktorant zmierzył stałą szybkości rodnika $\cdot\text{N}_3$ w tych samych warunkach pH, w których dokonał pomiaru dla rodnika $\text{CO}_3^{\cdot-}$? Biorąc pod uwagę potencjały redukcji użytych rodników należałoby oczekiwać wyższej stałej szybkości rodnika $\text{CO}_3^{\cdot-}$ z próbnikiem Amplex Red (AR) w porównaniu z $\cdot\text{N}_3$. Należy jednak pamiętać, że w przypadku rodnika $\text{CO}_3^{\cdot-}$ należałoby ekstrapolować wartość stałej szybkości do zerowej wartości siły jonowej roztworu. (v) str. 90: wyznaczony przez doktoranta potencjał redukcji rodnika Amplex Red (AR^\cdot) $E(\text{AR}^\cdot/\text{Ar}) = 1.14 \text{ V}$. Na tej podstawie doktorant wyjaśnia brak produktu jednoelektronowego utleniania AR przez rodnik glutationylowy (GS^\cdot) (str. 89) biorąc pod uwagę potencjał redukcji tego rodnika $E(\text{GS}^\cdot, \text{H}^+/\text{GSH}) = 0.94 \text{ V}$. Jak w takim razie doktorant może uzasadnić obecność produktów jednoelektronowego utleniania AR przez rodnik $\cdot\text{NO}_2$ (rys. 5.12), jeśli potencjał redukcji $\cdot\text{NO}_2$, $E(\cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^-) = 1.04 \text{ V}$ i jest również niższy od potencjału redukcji AR^\cdot ? (vi) str. 71 i 111: nie jest dla mnie jasne co oznaczają parametry $^1k_{\text{elem}}$ i $^2k_{\text{elem}}$, które występują w równaniach 6.1 i 4.8, 6.2, a stwierdzenie, że są to tzw. elementarne stałe szybkości reakcji nadal wiele mi nie wyjaśnia. Co rozumie doktorant przez ten termin i jak należy interpretować 1 i 2 w superskryptach?

Ostatnie cztery rozdziały rozprawy zawierają streszczenie rozprawy, podziękowania, spis cytowanej literatury (bibliografię), oraz w postaci załącznika kopie prac związanych z opisywanym materiałem badawczym. Liczba i trafny dobór cytowanej literatury (uwzględniający również ostatnie lata) świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu doktoranta w literaturze związanej z zagadnieniami zawartymi w rozprawie.

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

- wykazanie, że próbnik Amplex Red może być utleniany przez selektywne jednoelektronowe utleniacze ($\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{N}_3$ i $\text{CO}_3^{\cdot-}$) i z tego powodu nie może być stosowany jako selektywny próbnik do oznaczania nadtlenu wodoru (H_2O_2),
- wykazanie, że nadtlenozotyn (ONOO^-) nie utlenia bezpośrednio próbnika Amplex Red i wyjaśnienie, że są odpowiedzialne za to rodniki $\cdot\text{NO}_2$ i anionorodniki $\text{CO}_3^{\cdot-}$ powstałe w wyniku rozpadu produktu przejściowego reakcji ONOO^- z CO_2 ,
- wykazanie i wyjaśnienie ograniczenia detekcji H_2O_2 i ONOO^- przez próbnik Amplex Red w obecności wysokich stężeń glutationu,
- wyznaczenie stałych katalitycznych reakcji Amplex Red w układzie $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HRP}$ i ONOO^-/HRP , co umożliwi dobranie warunków w których można ograniczyć utlenianie próbnika przez ONOO^- , przy jednoczesnym utrzymaniu wydajności utleniania próbnika przez H_2O_2 ,
- opracowanie metody wykorzystującej próbnik Amplex Red i próbnik boronowy do jednoczesnej detekcji i rozróżnienia sygnałów analitycznych pochodzących od H_2O_2 i ONOO^- ,
- wykazanie, że wysoka reaktywność boronowego próbnika Peroxy Crimson z glutationem znacząco ogranicza wykorzystanie tego próbnika do detekcji ONOO^- ,
- wykazanie, że trifenylofosfoniowe izomeryczne pochodne kwasu fenylo-boronowego mogą służyć jako selektywne próbki do detekcji ONOO^- w mitochondriach w oparciu o analizę mieszaniny poreakcyjnej wykorzystując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

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, które oczywiście nie mają wpływu na merytoryczną bardzo wysoką ocenę rozprawy: **str.11:** „...z **biologicznych celów** anionorodnika ponadtlenkowego...”, **str.62:** **przyroście** sygnału, **str. 66:** wykładnik potęgi przy wartości liczbowej podającej wydajność radiacyjną jest błędny, powinno być **-7** a nie **7**, **str. 72:** „Anionorodnik generowany był...” dla jasności prezentacji należy podać który anionorodnik miał doktorant na myśli; **przyrostu absorpcji**, **str. 75:** **umiarkowana absorpcja**.

Reasumując, rozprawa doktorska mgr. inż. Dawida Dębskiego zawiera oryginalne i cenne wyniki związane z badaniami kinetycznymi i mechanizmami reakcji rodnikowych z udziałem RFTiA i wybranymi próbnikami. Doktorant umiejętnie stawiał i rozwiązywał trudne niekiedy zagadnienia związane z zaprojektowaniem odpowiedniego układu chemicznego oraz wykazał umiejętność późniejszej interpretacji otrzymanych wyników. Ostrożność i krytycyzm doktoranta przy interpretacji i wyciąganiu wniosków świadczy o Jego dużej dojrzałości naukowej. W zasadzie, wszystkie postawione przez mgr. inż. Dawida Dębskiego cele badawcze rozprawy zostały przez Niego zrealizowane. Jestem przekonany, że doktorant nie tylko przygotował bardzo wartościową rozprawę, ale przy tej okazji zdobył dużą wiedzę związaną z procesami rodnikowymi zachodzącymi w bardzo złożonych układach chemicznych.

Powyższe stwierdzenia upoważniają mnie do sformułowania końcowej opinii, że **rozprawa doktorska mgr. inż. Dawida Dębskiego 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. inż. Dawida Dębskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie (załącznik).**



(prof. dr hab. Krzysztof Bobrowski)

Warszawa, 17 września 2016