



Dr hab. inż. Dariusz Pogocki, Prof. UR.

Rzeszów, 26.04.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Bartosza Michałowskiego

pt. „Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem wybranych próbników fluorescencjogennych”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Bartosza Michałowskiego została wykonana w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. inż. Andrzeja Marcinka i promotora pomocniczego Dr inż. Adama Sikory.

Rozprawa ta, przedstawiona na stu siedemdziesięciu czterech stronach maszynopisu, stanowi jednolite opracowanie naukowe o bardzo obszernym materiale doświadczalnym. Do pracy autor załączył wykaz publikacji, których jest współautorem w tym dwóch dotyczących bezpośrednio tematu pracy, opublikowanych we *Free Radical Biology and Medicine* oraz w *Pharmacological Reports*. Dołączone do pracy zostały także manuskrypty dwóch prac przygotowanych do opublikowania.

Praca została poświęcona metodom detekcji reaktywnych form tlenu i azotu (RFTiA), a w szczególności poznaniu mechanizmów działania wybranych próbników fluorescencjogennych - hydroetydyny i jej pochodnych oraz próbników diaminowych - na skutek reakcji z RFTiA przekształcających się w związki fluorescencyjne, wykrywających obecność odpowiednio $O_2^{\cdot-}$ i $\cdot NO$. Ze względu na wysoką czułość technik fluorescencyjnych należą one do grupy najczęściej wykorzystywanych narzędzi w detekcji RFTiA. W zamyśle autora, poznanie mechanizmów działania próbników powinno się przyczynić do ich udoskonalenia zmierzającego do poprawy ich selektywności w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

We wstępie do rozprawy (rozdział 1) autor słusznie zauważył, że „opracowanie selektywnych metod detekcji reaktywnych form tlenu oraz reaktywnych form azotu wciąż

pozostaje dużym wyzwaniem. Wynika to między innymi z wysokiej reaktywności tych indywiduów i ich krótkiego czasu życia w środowisku komórkowym.” Trudno się nie zgodzić z tym poglądem a także i z tym, iż „w wielu przypadkach wyniki otrzymane z wykorzystaniem tych próbników są błędnie interpretowane. Dzieje się tak, głównie ze względu na brak dokładnej znajomości mechanizmu detekcji, niedostatecznej wiedzy na temat reaktywności użytego próbniaka względem innych RFTiA obecnych w komórce oraz braku informacji na temat wpływu różnych czynników komórkowych na wydajność detekcji badanego indywiduum.” Pewne potwierdzenie tezy autora znajduję w swoim doświadczeniu czytelnika i recenzenta prac z zakresu nauk o życiu. Autorzy dużej części tych prac zadawałają się binarną, zero-jedynkową interpretacją wyników uzyskanych za pomocą sond / zestawów („kits”) fluorescencyjnych. Dość typowe jest bezrefleksyjnie traktowanie eksperymentu jako „black-box”, bez wchodzenia w szczegóły interpretacyjne i z pominięciem takich zjawisk jak efekt filtra wewnętrznego, wygaszanie fluorescencji i podobne.

Podjęcie przez autora tej interesującej tematyki uważam za niezwykle ważne. Na podkreślenie zasługuje też fakt, że autor zajmuje się tą problematyką we współpracy z przedstawicielami wielu ośrodków i dyscyplin naukowych, na co wskazują afiliacje współautorów opublikowanych i przygotowanych prac.

Postawione cele badawcze i wyprowadzone wnioski lokują zagadnienia prezentowane w rozprawie w obrębie szeroko pojętej diagnostyki molekularnej. W szczególności dotyczą one badania zjawisk towarzyszących stresowi oksydacyjnemu w układach biologicznych. W tym sensie wykraczają one swoim znaczeniem poza zakres badań podstawowych, jakkolwiek prezentują istotny wkład podstawowych badań fizykochemicznych do rozwoju diagnostyki.

Przedłożona mi do oceny rozprawa ma dość indywidualny układ wynikający, jak sądzę, ze złożoności problemu badawczego, którym autor się zajmował.

Rozdziały 2 i 3 („Reaktywne formy tlenu i azotu” oraz „Metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu”) autor poświęcił właściwościom fizykochemicznym oraz reaktywności wybranych reaktywnych form tlenu i azotu. Bardzo szczegółowo opisał metody detekcji $O_2^{\cdot-}$ i 1NO , kładąc szczególny nacisk na trudności eksperymentalne i wyzwania związane z wykorzystaniem próbników w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*. Opisał także, co uważam za bardzo cenne, oczekiwane „Właściwości idealnego próbniaka”.

Podsumowując część literaturową pracy (autor nie używa tej nazwy, mam tu na myśli rozdziały 2 i 3) mogę stwierdzić, że została ona napisana w sposób niewątpliwie kompetentny, usystematyzowany i pomimo złożoności problemu bardzo przejrzysty. Autor nie uniknął jednak typowego błędu, jakim jest napisanie czegoś w rodzaju monografii czy

rozdziału podręcznika, w który stara się przedstawić całą podstawową wiedzę z dziedziny, którą się zajmuje, a która, jak widać, bardzo go interesuje. (W samej tylko części literaturowej autor powołuje się na 260 prac źródłowych!) Jest to jednak wada, którą można przekuć w zaletę publikując materiał w formie artykułu przeglądowego, którego adresatem mogliby być czytelnicy *Wiadomości Chemicznych* (PTCHEM), a może lepiej *Postępów Biochemii* (PTBIOCH), których, jak się wydaje, duża część zapewne należy do użytkowników „kitów”. Chciałbym tutaj dodać, że czekam na taką publikację i niezależnie od tego czy się ona ukaże, czy też nie, wiedzę uzyskaną podczas lektury części literaturowej pracy będę próbował wykorzystać w mojej pracy dydaktycznej na kierunku biotechnologia w Uniwersytecie Rzeszowskim.

W rozdziale 4 („*Metodyka pracy*”) autor szczegółowo opisuje zastosowaną w pracy metodykę badawczą i użyte techniki eksperymentalne. W swojej pracy eksperymentalnej autor wykorzystywał szeroki i unikalny, a dostępny w MITR PŁ, zestaw metod badawczych: (i) metodę radiolizy impulsowej niskotemperaturowych szkliv organicznych, (ii) metody spektroskopii molekularnej absorpcyjnej i emisyjnej, (iii) ultra-sprawną chromatografię cieczową z detekcjami absorpcyjną i spektrometrii mas. Interpretację wyników otrzymanych metodami spektroskopowymi autor podbudował także wynikami obliczeń kwantowo-mechanicznych metodami funkcjonału gęstości elektronowej (DFT), a także symulacjami kinetyki reakcji konkurujących. W opisie zastosowanych metod badawczych, a także metodyki interpretacji uzyskanych tymi metodami wyników autor odwołuje się do bez mała sześćdziesięciu prac źródłowych.

Nie mam do tej części pracy większych z zastrzeżeń. Uważam że metody eksperymentalnie i obliczeniowe zostały dobrze i starannie dobrane a autor bardzo dobrze wykorzystał unikalne instrumentarium dostępne w MITR PŁ.

W rozdziałach 5, 6 i 7 („*Charakterystyka produktów reakcji jednoelektronowego utleniania HE i jej pochodnych*”; „*Wpływ wybranych związków na detekcję $O_2^{\cdot-}$ z wykorzystaniem HE.*”; „*Detekcja $\cdot NO$ z wykorzystaniem wybranych próbników diaminowych.*”) autor przechodzi do przedstawienia i omówienia uzyskanych przez siebie wyników. W każdym z rozdziałów omówienie to jest poprzedzone szczegółowym określeniem celu i zakresu przeprowadzonych badań.

Sądzę, że autorowi udało się zrealizować postawione cele badawcze i zweryfikować stawiane hipotezy. W pełni zgadzam się z wnioskami wyprowadzonymi na podstawie bogatego materiału doświadczalnego.

Jak każda dobra rozprawa naukowa również i ta skłania do pewnych uwag i komentarzy, które w skrótovej formie przedstawię poniżej:

(1) Badana w pracy hydroetydyna (a także jej pochodne) posiadają w swojej strukturze centrum asymetryczne. Jak rozumiem w praktyce laboratoryjnej używana jest mieszanina racemiczna enancjomerów tego związku? Czy należy się spodziewać innych zachowań próbnika gdyby użyto wybranych enancjomerów? Mam tu na myśli np. oddziaływania próbnika ze szczeliną DNA, które jak się wydaje powinny być enancjoselektywne. Czy tworzenie przez enancjomery HE różnych chiralnych (diastereoizomerycznych) kompleksów z asymetrycznymi cząsteczkami otoczenia biologicznego może mieć wpływ na przebieg procesu utleniania HE? Czy to samo zjawisko może mieć istotny wpływ na wygaszanie fluorescencji?

(2) Jak się wydaje co najmniej pierwszy etap reakcji utleniania HE do kationorodnika HE^{2+} powinien być odwracalny i w wypadku użycia wybranego enancjomeru prowadzić do racemizacji związku. Czy wg. autora racemizacja związku mogłaby być dodatkowym dowodem na prawdziwość zaproponowanego, wieloetapowego mechanizmu utleniania próbnika? Czy zdaniem autora taki eksperyment byłby możliwy do wykonania?

(3) Wartość pK_a grupy tiolowej w cysteinie i glutatione wynosi około 10,5. Eksperymenty radiolizy, w których generowano rodniki sulfanylowe (RS^{\cdot}) były przeprowadzane w pH około 7,4. W tych warunkach stężenie anionów RS^- powinno być znikome. Jakie uzasadnienie znajduje w tych warunkach rozpatrywanie reakcji prowadzącej do tworzenia dimerowego anionorodnika ($RSSR^{\cdot-}$)?

(4) Moje wątpliwości wzbudza też możliwość zachodzenia reakcji z udziałem rodników sulfanylowych w sposób przedstawiony równaniami 5.7 i 5.9. Rodniki sulfanylowe są słabymi utleniaczami i reagują raczej przez oderwanie wodoru, szczególnie gdy BDE wiązania S-H jest większa niż C-H. Wydaje się, że z takim przypadkiem możemy mieć do czynienia dla hydroetydyny, w której atom wodoru związany z węglem asymetrycznym jest tzw. wodorem aktywowanym a rodnik α -aminoalkilowy powstający po jego oderwaniu jest stabilizowany rezonansowo przez elektrony π pierścieni aromatycznych i niewiążącą parę elektronową azotu aminowego. Proszę autora o ustosunkowanie się do proponowanej hipotezy.

Podczas publicznej obrony pracy oczekuję komentarza autora do zasygnalizowanych problemów.

Należy podkreślić, że rozprawa została bardzo starannie, wręcz perfekcyjnie, wyedytowana za co należą się autorowi słowa uznania. Sprawia to jednocześnie, że nie udało mi się odnaleźć istotnych uchybień w korekcie manuskryptu.

Wymienione pytania i uwagi do rozprawy nie umniejszają w istotny sposób wartości rozprawy doktorskiej, którą oceniam wysoko. Autor w pełni osiągnął nakreślone cele badawcze i podbudował wyniki solidną interpretacją, ucząc się przy tym także bardzo wiele. Dlatego dobrze się stało, że większość uzyskanych przez autora wyników została przedstawiona międzynarodowemu środowisku naukowemu w formie artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia przepisane ustawa wymogi stawiane pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Bartosza Michałowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Całość realizowanego przez autora projektu naukowego, którego recenzowana rozprawa jest tylko częścią, pokazuje zaangażowanie i dociekliwość badawczą doktoranta, co bardzo dobrze wróży jego przyszłości zawodowej.

Dariusz Fogochi