



Prof. dr hab. Bronisław Marciniak
Zakład Fizyki Chemicznej
ul. Umultowska 89b
60-780 Poznań
marcinia@amu.edu.pl

Poznań, dnia 28 maja 2018

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy Gapys
pt. *”Mechanistyczne aspekty reaktywności wodoronadtlenków generowanych na aminokwasach, peptydach i białkach”*

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Gapys pt. *”Mechanistyczne aspekty reaktywności wodoronadtlenków generowanych na aminokwasach, peptydach i białkach”* wykonana została w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Marcinka, promotora doktoratu. Promotorem pomocniczym był dr inż. Radosław Michalski. Praca dotyczy aktualnej i o dużym znaczeniu tematyki, a mianowicie opisanie metod detekcji i reaktywności ważnych biologicznie wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek. Jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych od wielu lat, z wielkim powodzeniem, przez profesora Marcinka i Jego grupę badawczą.

Praca doktorska prezentuje obszerny materiał eksperymentalny i stanowi zwarte opracowanie naukowe o dużym znaczeniu poznawczym. Została przedstawiona w formie tradycyjnej rozprawy i zawiera: wstęp, przegląd literaturowy wraz z opisaniem obecnych metod detekcji wodoronadtlenków oraz ich zmiataczy, metodykę pracy z częścią eksperymentalną, cel pracy, wyniki badań i ich dyskusję przedstawione w dwóch podstawowych rozdziałach: rozdział 6, *„Detekcja wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek z wykorzystaniem próbników boronowych”* oraz rozdział 7 *„Reaktywność wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek”*, a także streszczenie w języku polskim oraz bibliografię. Praca zawiera także bardzo przydatny dla czytelnika wykaz skrótów.

Została przedstawiona w sposób zwięzły na 155 stronicach; zawiera 65 rysunków (w pracy przyjęto konwencje zapisywania schematów reakcji i wzorów chemicznych jako rysunki), 13 tabel oraz obszerny zestaw cytowanej literatury - 233 pozycje literaturowe. Do rozprawy dołączono także streszczenie w języku angielskim.

Jedyna uwaga, którą chciałbym w tym miejscu przekazać, dotyczy języka rozprawy. Szkoda, że Doktorantka nie przedstawiła swojej pracy doktorskiej w języku angielskim. W mojej opinii przedstawianie prac doktorskich w naukach przyrodniczych i ścisłych w języku angielskim powinno stać się zwyczajem w Polsce, jak to ma miejsce w wielu europejskich, czołowych ośrodkach naukowych. Zamieszczenie obszernego streszczenia w języku polskim umożliwiłoby zapoznanie się z wynikami badań wszystkim zainteresowanym w kraju.

W części wprowadzającej obejmującej takie rozdziały jak: *Wstęp, Przegląd literaturowy, Metody detekcji wodoronadtlenków oraz Zmiatacze wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek* Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje literaturowe dotyczące przedmiotu rozprawy. Część ta została napisana w sposób poprawny, a prezentowany materiał został oparty na ponad dwustu trzydziestu cytowanych publikacjach. Mgr Gapys ma niewątpliwie umiejętność krótkiego i jasnego prezentowania swoich rozważań. W mojej opinii prezentacja omawianych w części literaturowej zagadnień jest w zupełności wystarczającym wprowadzeniem w omawiane dalej problemy badawcze.

Najważniejszym celem pracy, jak pisze Doktorantka we wstępnej części rozdziału 6, było „opracowanie metody detekcji wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek opartej na wykorzystaniu profluorescencyjnych próbników boronowych”. Utleniacze występujące w układach biologicznych (w tym także reaktywne formy tlenu) reagując z materiałem biologicznym tworzą grupy wodoronadtlenkowe na resztach aminokwasowych białek, co w konsekwencji prowadzi do zmiany struktury i właściwości białek i ich uszkodzeń. Zatem opracowanie prostej metody detekcji wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek ma ważne znaczenie nie tylko badawcze ale także i aplikacyjne. Dodatkowo, Doktorantka wykazała we wstępie rozprawy, iż obecnie stosowane metody detekcji wodoronadtlenków mają poważne ograniczenia. Wyniki badań i dyskusja dotycząca realizacji tego celu badawczego została przedstawiona w rozdziale 6 rozprawy, stanowiącym podstawową i najważniejszą jej część.

Mając opracowaną i przetestowaną metodę detekcji wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek (także w układach komórkowych) Doktorantka sprecyzowała drugi cel badawczy, a mianowicie sprawdzenie reaktywności tych wodoronadtlenków względem wybranych zmiataczy:

salenowych kompleksów manganu(III) oraz związków selenoorganicznych. Realizacja tego celu badawczego została przedstawiona w rozdziale 7 rozprawy.

Podjęte w rozprawie cele badań uważam za ambitne i w pełni uzasadnione naukowo.

Na podkreślenie zasługuje rozdział 5 rozprawy „*Metodyka pracy*”. Został przygotowany w sposób jasny, przejrzysty i zwięzły. Jak już wspomniałem Doktorantka ma umiejętność krótkiej i zwartej prezentacji badań. Zostały w nim przedstawione stosowane odczynniki, metody generowania wodoronadtlenków: fotochemiczna, enzymatyczna i radiolityczna wraz z niezbędną aparaturą badawczą taką jak: spektrofotometria UV-VIS, spektrofluorymetria, chromatografia cieczowa, spektrometria mas, a także opis metodyki badawczej generowania wodoronadtlenków i ich analizy w układach komórkowych. Ostatnią częścią rozdziału 5 jest podrozdział „*Metody opracowania wyników*” przedstawiający równania stosowane do wyznaczania stałych szybkości reakcji, także dla kinetyki kompetencyjnej dwóch reakcji pseudopierwszego rzędu.

Badania mgr inż. Ewy Gapys zawarte w rozprawie doktorskiej, przyniosły niewątpliwie wiele nowych i oryginalnych wyników rozszerzających wiedzę o reaktywności wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek i metodach ich detekcji, także w układach biologicznych.

Do najważniejszych osiągnięć pracy doktorskiej mgr inż. Ewy Gapys zaliczam:

1. Dobór nowoczesnej i mającej duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne tematyki badań, a przede wszystkim opracowanie metody detekcji wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek z wykorzystaniem profluorescencyjnych próbników boronowych.
2. Zbadanie reaktywności szeregu próbników boronowych z wybranymi wodoronadtlenkami modelowych aminokwasów (m.in. tyrozyny) i zaproponowanie próbniaka CBA (7-boronokumaryny) jako najbardziej przydatnego związku do detekcji wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów oraz białek, co zostało eksperymentalnie sprawdzone dla dwóch modelowych białek, lizozymu oraz surowiczej albuminy wołowej, a także w układach komórkowych. Wykazanie zalet proponowanego próbniaka CBA w stosunku do obecnie stosowanych metod detekcji wodoronadtlenków, m. in. metody ferrometrycznej FOX.
3. Zastosowanie różnych metod do generowania wodoronadtlenków: fotochemicznej (polegającej na reakcji aminokwasów z tlenem singletowym), enzymatycznej (z udziałem peroksydazy chrzanowej i oksydazy ksantynowej prowadzącej w przypadku modelowego aminokwasu tyrozyny do reakcji rodnika tyrozyłowego z

anionorodnikiem ponadtlenkowym $O_2^{\cdot-}$) oraz radiolitycznej (reaktywny rodnik hydroksylowy OH^{\cdot} czynnikiem utleniającym).

4. Wyznaczenie drugorzędowych stałych szybkości reakcji kilkunastu wodoronadtlenków aminokwasów i peptydów z próbnikami boronowymi (m.in. CBA) i wykazanie ich zależności od struktury stosowanego wodoronadtlenku.
5. Zbadanie reaktywności wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek względem wybranych zmiataczy salenowych kompleksów manganu(III) i wykazanie iż drugorzędowe stałe szybkości reakcji są rzędu $10^2 M^{-1}s^{-1}$ i zależą od struktury kompleksu (obecności podstawników i pierścieni aromatycznych). Zaobserwowanie korelacji pomiędzy drugorzędowymi stałymi szybkości reakcji rozkładu wodoronadtlenku tyrozyny (TyrOOH) z salenowymi kompleksami Mn(III) oraz z nadtlenoazotynem.
6. Wyznaczenie drugorzędowych stałych szybkości reakcji wodoronadtlenków aminokwasów i peptydów z wybranymi związkami selenoorganicznymi: seleno-L-metioniną i ebselenem.
7. Wykazanie iż efektywność zmiatania wodoronadtlenków aminokwasów i peptydów charakteryzowana jest przez następującą zależność:

ebselen ($10^3 M^{-1}s^{-1}$) > salenowe kompleksy Mn(III) ($10^2 M^{-1}s^{-1}$) > seleno-L-metionina ($10^1 M^{-1}s^{-1}$).

Ważnym podkreślenia jest umiejętne zastosowanie różnorodnych i właściwie dobranych metod badawczych umożliwiających zrealizowanie założonych celów badawczych. Doktorantka zastosowała także różnorodne metody generowania wodoronadtlenków aminokwasów, peptydów i białek: enzymatyczne, fotochemiczne (tlen singletowy utworzony w reakcji fotosensybilizowanej różem bengalskim jako czynnik utleniający), radiolityczne (radioliza wodnych roztworów aminokwasów nasyconych tlenem) oraz odpowiednie metody badania kinetyki reakcji (fluorescencja, chromatografia cieczowa, spektrometria mas). Przemysłany dobór substratów do badanych reakcji i warunków eksperymentalnych umożliwił uzyskanie wartościowych wyników.

Krytyczna uwaga, która nasunęła się w trakcie czytania rozprawy dotyczy części fotochemicznej pracy, a ściślej nie zastosowania bezpośredniej metody obserwacji tlenu singletowego (emisji 1O_2 w zakresie bliskiej podczerwieni 1270 nm). Zastosowane pośrednie metody, takie jak wygaszanie reakcji za pomocą azydki sodowego oraz prowadzenie reakcji w D_2O , są dowodami przyjmowanymi powszechnie za wystarczające. W przypadku konieczności uzyskania bezpośredniego dowodu na obecność tlenu singletowego w przyszłych badaniach proponuję wykonanie tych pomiarów w laboratorium w Poznaniu.

Druga uwaga dotyczy luminescencyjnych właściwości 1-boronopirenu i 1-hydroksypirenu (str. 106 rozprawy). Wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_f) jest parametrem charakteryzującym jak „silna” jest fluorescencja. Szkoda, że Doktorantka nie wyznaczyła wartości Φ_f dla obu pochodnych pirenu, w miejsce stwierdzenia iż „sam próbnik wykazuje silną fluorescencję”.

Trzecia uwaga dotyczy braku podjęcia próby wyjaśnienia obserwowanej eksperymentalnie zmiany reaktywności wodoronadtlenków aminokwasów i peptydów w reakcji z CBA (kwas 7-boronokumarynowy) (str. 90, Tabela 6 oraz str.102, Tabela 7) w zależności od struktury wodoronadtlenku (Tabela 5).

Jak wynika z ocenianej rozprawy, a także z załączonego CV, Doktorantka należy do grupy młodych naukowców umiejących z powodzeniem prowadzić badania z zastosowaniem różnorodnych metod badawczych fotochemii, chemii radiacyjnej i metod chemii analitycznej. Potrafi analizować uzyskane wyniki uwzględniając obszerną literaturę przedmiotu badań leżącego na pograniczu chemii i biologii. Jest współautorem jednej publikacji naukowej i kilkunastu prezentacji konferencyjnych. Uczestniczyła także w dwóch projektach badawczych NCBiR i FNP realizowanych na PŁ. Realizacja przez Doktorantkę dobrze zaplanowanych badań i systematyczny Jej rozwój naukowy zasługują na pozytywną ocenę.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Gapys odpowiada swoim poziomem naukowym i metodycznym wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie pracy i dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Bronisław Marciniak