

Jacek Waluk

Instytut Chemii Fizycznej PAN

Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

Warszawa, 13.6.2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mileny Reszki

Praktyczne wykorzystanie wyników badań podstawowych jest marzeniem wielu badaczy. Obszar, na którym realizacja tego marzenia staje się możliwa, to projektowanie czujników opartych na zasadzie przetwarzania sygnałów elektrycznych czy optycznych. Wśród tych ostatnich niezwykle ważną rolę pełnią czujniki fluorescencyjne, a zakres ich stosowania ogranicza jedynie wyobraźnia uczonych. Rozprawa doktorska mgr Mileny Reszki bardzo dobrze wpisuje się w tę intensywnie rozwijaną dziedzinę. Praca zatytułowana *Fluorescencyjne wskaźniki aktywności β -glikozydaz wykazujące zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym* wykonana została w Zespole Glikochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem była dr hab. Beata Liberek, prof. UG, a promotorem pomocniczym dr Illia Serdiuk.

Celem pracy było zaprojektowanie, wykonanie oraz przetestowanie sond fluorescencyjnych służących do śledzenia aktywności β -glikozydaz - enzymów katalizujących hydrolizę wiązania glikozydowego. Do realizacji tego zadania wykorzystano związki wykazujące zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w stanie elektronowo-wzbudzonym (ang. ESIPT – excited state intramolecular proton transfer). Zasada działania takiego typu czujnika polega na pomiarze zmian intensywności fluorescencji pochodzącej od formy tautomerycznej fluoroforu. Emisja ta jest nieobecna w wyjściowej formie czujnika, którą jest β -glikozyd pochodnej 3-hydroksychromen-4-onu. Fluorescencja fototautomeru pojawić

się może tylko dla fluoroforu niezwiązanego chemicznie z resztą cukrową, dlatego też śledzenie zmian intensywności tej emisji w funkcji czasu dostarcza informacji o kinetyce hydrolizy, a więc o aktywności enzymatycznej.

Rozprawa doktorska mgr Reszki ma charakter tradycyjny. Liczy w sumie 142 strony, wykaz literatury zawiera 183 pozycje. Praca podzielona jest na pięć głównych rozdziałów. We wstępie literaturowym autorka przedstawia właściwości glikozydaz. Omawia także uprzednio stosowane wskaźniki ich aktywności, wskazując ich słabe strony. Przechodzi następnie do omówienia charakterystyk strukturalnych, biologicznych, spektralnych i fotofizycznych flawonoli – związków będących przedmiotem rozprawy.

Cele pracy sformułowano w rozdziale 2. Następuje po nim część doświadczalna, poświęcona warunkom syntezy, procedurom pomiarów spektroskopowych i fotofizycznych oraz metodologii obliczeń służących do analizy rozkładu ładunku. Najistotniejszy dla rozprawy jest Rozdział 4, w którym autorka szczegółowo omawia wyniki procedur syntetycznych, analizuje i uzasadnia dobór warunków pomiarowych dla absorpcji i fluorescencji, a wreszcie przedstawia dane fluorescencyjne obrazujące przebieg hydrolizy enzymatycznej. Rozdział 5 stanowi liczące 14 punktów podsumowanie. Rozprawę zamyka spis dorobku naukowego autorki, na który składają się trzy publikacje, trzynaście komunikatów na zagranicznych i krajowych konferencjach, a także uzyskanie grantu NCN PRELUDIUM (2019-2020).

Moje ogólne wrażenie po lekturze rozprawy doktorskiej mgr Reszki jest bardzo dobre. Na podkreślenie zasługuje ogrom pracy wykonanej przez doktorantkę. Co więcej, mamy do czynienia zarówno z osiągnięciami syntetycznymi, jak i spektroskopowymi, a uzyskane czujniki

mogą być najprawdopodobniej stosowane w diagnostyce i terapii medycznej. Z całą pewnością rozprawa zasługuje na miano interdyscyplinarnej.

Wyniki rozprawy dość przekonująco pokazują, że zaprojektowanie przez doktorantkę czujniki dobrze sprawdzają się w przewidywanej dla nich roli. Wykorzystanie fluorescencji tautomerycznej do monitorowania aktywności enzymatycznej jest świetnym pomysłem, ponieważ pozwala ono na uniknięcie efektów związanych z reabsorpcją oraz korzystne przesunięcie obszaru rejestracji emisji - w kierunku dłuższych fal. Pewnym mankamentem stosowanych fluoroforów jest niska wydajność kwantowa fluorescencji fototautomeru. Autorka zdaje sobie z tego sprawę, i dlatego stara się zwiększyć intensywność tej emisji poprzez dodatek BSA, czy też zastosowanie wzmacniającego emisję podłoża. Wzmocnienie fluorescencji w obecności BSA jest znaczne. A jednocześnie dodatek BSA nie wpływa na szybkość hydrolizy enzymatycznej. Ten wynik wydaje mi się zagadkowy. Nie znalazłem w rozprawie próby jego wyjaśnienia, spodziewam się dyskusji na ten temat na obronie.

Mam pewne zastrzeżenia dotyczące głównie metodologii pomiarów fluorescencji i interpretacji tych eksperymentów. Uważałbym je za dość istotne dla pracy czysto fotofizycznej, natomiast w obecnym przypadku nie podważają one głównych wyników rozprawy.

1. Podstawowym parametrem fotofizycznym, obok wydajności kwantowej, jest czas życia stanu wzbudzonego. Bez jego znajomości wnioski sugerujące np. zmiany wydajności kwantowej fototautomeryzacji, oparte wyłącznie na porównaniu intensywności (str. 71, 75) mogą być niepoprawne.

2. Na stronie 64 wymienione są wzorce do pomiarów wydajności kwantowych emisji, ale brakuje informacji, jakich wartości używano.
3. Na tej samej stronie (64) autorka opisuje zbadanie efektu MEF, stwierdzając: „wyniki dla podkładów srebrnych porównałam z podkładami kwarcowymi, wykonanymi w ten sam sposób”. To dość skąpa informacja, zważywszy na trudności przy porównywaniu absorpcji i emisji.
4. Z uwagi na skomplikowaną fotofizykę, widma emisji badanych przez doktorantkę związków mogą się zmieniać w zależności od długości fali wzbudzenia. Dlatego ważne jest podanie jej wartości przy każdym rysunku. Rysunki 36, 37 i 46 nie zawierają tej informacji.
5. Str. 63: mowa jest o cienkich i grubych foliach, ale nie podano wymiarów.
6. Str. 33: „...wpływ na ich aktywność biologiczną, co spowodowane jest m.in. zmianami w płaszczyźnie cząsteczki”. Chętnie usłyszę dokładniejsze wyjaśnienie tego efektu.
7. Str. 47: „...dla monitorowania zmian potencjału dipolowego”. Nie bardzo wiem, co to takiego.
8. Str. 44: „...takie właściwości rozpuszczalnika, jak polaryzacja...” – czy chodzi o polarność?

Strona redakcyjna rozprawy nie jest jej najsilniejszym punktem. Pracę czyta się dobrze, ale to wrażenie psuje spora liczba „literówek” i innych, zazwyczaj niezbyt istotnych pomyłek. Niektóre zdania wręcz domagają się przecinka! (str. 27, 28, 32, 35, 36, 42, 44, 73, 112). Na czternastu rysunkach brakuje polskich znaków diakrytycznych. Niezręczne jest łączenie polskiej i angielskiej terminologii („Intensywność Fluorescencji (a.u.)”).

Poniżej przytaczam wykaz dostrzeżonych błędów. sugerując dołączenie erraty do wersji rozprawy wystawionych na widok publiczny.

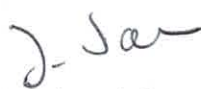
- str. 11: dublet dubletu >> dubletów
- str. 12: zystezowanych
- str. 13: proton-transfer: proton transfer
- str. 13: various pH >> pHs
- str. 15: sytnezy, różny
- str. 22: spowalnić
- str. 24: napoi
- str. 25: zaburzeia
- str. 43: elektronicznie wzbudzonych >> elektronowo
- str. 44: Wśród tych obszernych badaniach
- str. 44, 45: rozpuszczalnikach protonowych >> protycznych
- str. 45: dostarczył Mandal i Samanta >> dostarczyli
- str. 50: grubości 0,2 mmol
- str. 51: ESI >> brak tego akronimu w wykazie skrótów
- str. 51: UV-ViS, Wydziale Chemi
- str.60: cm³wody

- str. 64: ekstarkcji
- str. 64: mierzyłam widma fluorescencji długością fali wzbudzenia
- str. 66: absopbcji
- str. 73 i dalsze: brak polskich znaków diakrytycznych na Rys. 34, 35, 36, 37, 38, 41, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53
- str. 77: wiązań wodorowych
- str. 94: W czasie zerowym
- str. 97: elekronowymi
- str. 98: powlekałam spinowo
- str.121: analizy ESP: brak tego akronimu w wykazie skrótów
- str. 118, Rys. 52B, ós y: brakuje prawego nawiasu
- str. 129, odn. 54: niewłaściwe formatowanie

Powyższe uwagi nie wpływają na ogólną ocenę pracy. Uważam, że doktorantka zrealizowała z powodzeniem wyznaczone cele, a jej wyniki stanowią cenny wkład w dziedzinę projektowania czujników fluorescencyjnych.

Podsumowując: nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska mgr Mileny Reszki spełnia ustawowe i zwyczajowe wymogi stawiane doktorantom (ustawa z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz o zmianie niektórych innych ustaw

(Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455)). Wnoszę o dopuszczenie mgr Mileny Reszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na (i) interdyscyplinarny charakter rozprawy (ii) dobrze umotywowany, a następnie eksperymentalnie zweryfikowany wybór fluoroforów do konstrukcji czujników; (iii) udokumentowanie otrzymanych wyników w trzech publikacjach proponuję rozważenie możliwości wyróżnienia rozprawy.


Jacek Waluk