

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Lublin, 19 listopada 2017 r.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgra Dariusza Kluczyka pt. „Analiza spektroskopowa organizacji molekularnej wybranych 1,3,4-tiadiazoli oraz efektów ich działania w badaniach *in vivo* w modelu hipoksji normobarycznej u szczurów”

Dynamiczny rozwój badań obserwowany w obszarach naukowych biologii i medycyny wymaga od współczesnych badaczy formułowania pytań oraz poszukiwania odpowiedzi o budowie i funkcjonowaniu organizmów często na poziomie molekularnym. Niezbędnymi narzędziami eksperymentalnymi stają się wówczas wszelkiego rodzaju techniki pomiarowe oparte na spektroskopii i mikroskopii cząsteczek. Umożliwiają one śledzenie procesów zachodzących w żywych komórkach, włączając w to naprawę DNA, ruchy motorów molekularnych, transkrypcji, translacji, gaszenia elektronowych wzbudzeń nadmiarowych w procesie fotosyntezy czy też lokalizacji lub kolokalizacji molekuł przy użyciu np. rezonansowego przekazu energii typu Förstera. Poprzez oddziaływanie światła z materią dowiadujemy się o organizacji molekularnej poszczególnych grup cząsteczek (bardzo często również leków), o ich aktywności w działaniu na błony biologiczne, czy też tworzeniu nowych wiązań chemicznych. Badania wykonywane na układach modelowych służą do formułowania hipotez badawczych, które w następnych krokach weryfikowane są na próbkach *in vivo*.

W tę naturalną kolejność badań doskonale wpisują się eksperymenty opisane w rozprawie doktorskiej Pana mgra Kluczyka. Celem jego pracy było określenie organizacji molekularnej dwóch wybranych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli, wpływu tych pochodnych na modelowe błony lipidowe utworzone z dipalmitoylofosfatydylocholiny (DPPC) oraz ocena ich aktywności cytoprotekcyjnej w odpowiedzi na hipoksję normobaryczną u szczurów. Do badań wyselekcjonowano dwie pochodne 1,3,4-tiadiazoli; 4-(5-metyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol (C1, MTDBD) oraz 4-(5-heptyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol (C7, HTDBD)

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



zsyntetyzowane w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego, które - jak można się dowiedzieć - potwierdziły już swoją aktywność farmakologiczną w obszarze neuroprotekcijnym i przeciwzapalnym. Podjęta przez Doktoranta tematyka badań jest w mojej opinii interesująca oraz ważna w kontekście profilaktyki chorób układu krążenia.

Praca została wykonana w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, pod kierunkiem prof. dra hab. Mariusza Gagosia, przy współpracy dra Arkadiusza Matwijczuka, jako promotora pomocniczego. Wspomniany tutaj Wydział posiada długoletnią tradycję badań mikroskopowych, stając się cenionym ośrodkiem tego typu eksperymentów w kraju i zagranicą, a dzięki staraniom Promotora coraz śmielej wkraczającym również w obszar badań spektroskopowych.

Ocenianą rozprawę doktorską stanowi zestawienie czterech oryginalnych artykułów badawczych, opublikowanych w czasopismach specjalistycznych o zasięgu międzynarodowym, w których (sądząc po kolejności autorów) udział Doktoranta można uznać za istotny. Prace charakteryzują się różnorodnymi wartościami tzw. *impact factor* (*Przemysł Chemiczny* (IF 0,385) w której Doktorant jest trzecim w kolejności autorem, *Journal of Fluorescence* (IF 2,686), w której jest On czwartym w kolejności oraz dwie publikacje w *The Journal of Physical Chemistry B* (IF 3,177), w których jest odpowiednio pierwszym i drugim w kolejności. Pomimo formalnego zróżnicowania czasopism stanowiących integralną część rozprawy doktorskiej, wszystkie prace zawierają, w mojej ocenie, ważne rezultaty badań eksperymentalnych, traktując w sposób wieloaspektowy problemy zmniejszenia czy też niwelowania efektów niedotlenienia organizmu.

Praca doktorska ma formę klasyczną, z podziałem na typowe dla prac eksperymentalnych rozdziały i liczy 131 stron. Rozprawę rozpoczyna *Streszczenie* (przygotowane zgodnie z wymogami formalnymi w języku polskim i angielskim), które pozwala na zapoznanie się z tematyką badawczą podjętą przez Doktoranta. Po nim, umieszczony został *Wstęp*, który w sposób zwięzły i klarowny wprowadza do zagadnień charakterystyki chemicznej tiadiazoli oraz uszkodzeń powodowanych krótkotrwałymi okresami niedotlenienia organizmu. W rozdziale pt. *Cel pracy* Autor jasno określił zadania badawcze, a metodyka opisana w rozdziale *Materiały i metody* jest na tyle szczegółowa, iż umożliwia odtworzenie analogicznych eksperymentów. Najważniejszy i najbardziej obszerny rozdział zatytułowany *Wyniki badań i dyskusja* liczy 76 stron i zawiera 34 rysunki, w większości prezentujące kilka paneli z widmami czy diagramami. Tę część rozprawy uważam również za bardzo dobrze zredagowaną, chociaż najważniejszym jej pozytywnym aspektem są bardzo interesujące oraz wartościowe wyniki eksperymentalne. Rozprawę kończą *Podsumowanie*, *Wnioski*, *Materiały uzupełniające* oraz spis *Bibliografii*, w której zawarto 125 pozycji (w większości odnoszących się do prac oryginalnych).



W przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej badano samoorganizację dwóch homologów 1,3,4-tiadiazoli w funkcji ich stężenia, zmian polarność użytych do tego celu rozpuszczalników organicznych, zmian pH i temperatury. Zbadano wpływ tych czynników na kształt widm absorpcji, fluorescencji, wzbudzenia fluorescencji i rozproszenia światła. To właśnie prace badawcze prowadzone w ramach tej kategorii, przyczyniły się do przedstawienia stosunkowo pełnej charakterystyki spektroskopowej, na bazie której wnioskować można o organizacji molekularnej poszczególnych pochodnych tiadiazoli (monomerów i agregatów molekularnych), a także zbudować na tej podstawie odpowiadające im schematy poziomów energetycznych.

Badania przeprowadzone w dalszej części dotyczyły układów liposomalnych, utworzonych z DPPC i modyfikowanych wybranymi pochodnymi tiadiazoli (C1 i C7). Badania prowadzono w różnych zakresach stężeń (1-30% mol), wyrażających stosunek ilościowy molekuł związku do użytego lipidu. Eksperymenty (podobnie jak w pierwszej części pracy) wykonano przy użyciu technik absorpcji i emisji elektronowej, rozpraszania światła, spektroskopii oscylacyjnej w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR), a także skaningowej mikrokalorymetrii różnicowej (DSC). Otrzymane przez Doktoranta zmiany wartości temperatur (charakteryzujące główne przejście fazowe) wykreślone w funkcji stężenia pochodnej tiadiazoli, wskazują na wpływ tych ostatnich na swobodę migracji w błonie lipidowej. Na bazie opracowanych wyników otrzymano modulację wartości temperatury głównego przejścia fazowego w wyniku wzrostu stężenia związku C7 (różną od zaobserwowanego dla pochodnej C1). Wnioski, sformułowane na podstawie tych danych pokazują, że wzrost stężenia C1 powoduje zwiększenie płynności błony, a w przypadku C7 - usztywnienie błony dla jego dodatku 25% mol. Według opinii Autora, jako uzasadnienie dla takiego zachowania się układu pomiarowego z C7, wskazano rozpad agregatów molekularnych tiadiazoli połączony z równoczesnym ich uwolnieniem poza obszar błony liposomu.

W dalszej części badań poszukiwano spektroskopowych markerów aktywności biologicznej z wyselekcjonowanych przedstawicieli grupy tiadiazoli. W tym celu, przeprowadzono analizę widm FTIR próbek homogenatów tkanek (serc, nerek, osoczy oraz mózgów) pochodzących od szczurów badanych w modelu hipoksji normobarycznej z zastosowaniem pochodnej chemicznej oznaczanej jako C7. W eksperymentach tych, użyto kombinacji dawek substancji czynnej (50, 100, 2x50 mg/kg. m.c.) podawanych zwierzętom po wystąpieniu stanu niedotlenienia. Analizie poddano widma absorpcji w podczerwieni, a w szczególności obliczone na ich podstawie drugie pochodne. Ocena wyników polegała na wskazaniu różnic spektralnych pomiędzy próbkami pochodzącymi od zwierząt zdrowych oraz poddanych hipoksji, a następnie



obserwacji łagodzenia tych zmian w wyniku podawania związku C7. Najlepsze rezultaty niwelowania efektu niedotlenienia obserwowano dla dawki 50 mg/kg m.c. pochodnej tiadiazolu.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji o własnościach pochodnych tiadiazoli i ich wpływie na skutki spowodowane niedotlenieniem organizmów, ale jednocześnie nasuwają pewne pytania:

1. Jakie własności chemiczne pochodnych tiadiazoli predestynowały je do użycia w kierunku cytoprotekcyjnym w modelu hipoksji normobarycznej? Jaki czynnik zadecydował, że to właśnie te dwie pochodne (C1 i C7) wybrano do badań?
2. Interpretacja wyników dotycząca zmian spektralnych widm absorpcji i fluorescencji wykreślona w funkcji stężenia związków C1 i C7 oraz zaprezentowana na rys. 6 i 7 wskazała (według Autora) na obecność różnych form zagregowanych tych cząsteczek. Zastanawiam się czy zmiany obserwowane w widmie emisji, a przypisane tzw. dualnej fluorescencji oraz przesuwaniu się jej maksimów nie są spowodowane efektem reabsorpcji światła, co przy tak dużych analizowanych stężeniach tych związków oraz przekrywaniu się widm absorpcji i emisji byłoby bardzo prawdopodobnym efektem? Jak wówczas zmieniłby się schemat poziomów energetycznych zaprezentowany na rys. 11?
3. Czy zmiany obserwowane w widmie wzbudzenia fluorescencji (rys. 8), a interpretowane jako pojawianie się kolejnych pasm ekscytonowych przy ok. 260 nm oraz 340 nm nie są spowodowane efektem tzw. filtra wewnętrznego (*ang.* „inner filter effect”)? Jaką inną, analogiczną metodę pomiaru widma wzbudzenia fluorescencji mógłby Doktorant zaproponować, by zweryfikować tę niejasność?
4. Bardzo pomysłowe wydaje mi się użycie techniki rozpraszania światła do detekcji form zagregowanych tiadiazoli. Zastanawiam się, czy nie nastąpiła jednak nadinterpretacja tych widm (zaprezentowanych na rys. 9), gdzie analizowane są kolejne maksima uzyskane tą techniką wraz z przypisaniem im poziomów elektronowych? Należy pamiętać, że proces rozproszenia światła może współuczestniczyć z absorpcją energii w obszarze pasm elektronowych, co mogłoby wpływać również na pojawianie się maksimów intensywności w widmie RLS.
5. Na rys. 13 rozprawy, Doktorant rozważa różnego typu formy zagregowane pojawiające się w funkcji zmian pH. Na str. 53 pisze On, że „Dodatkowo przy pH 7-8 widać wyraźnie poszerzenie pasm absorpcji badanych związków -



sugerując obecność większej ilości form spektralnych w próbkach.” Czy punkty izobestyczne rejestrowane przy ok. 330-340 nm nie wskazują na występowanie jedynie dwóch form wybranych do badań tiadiazoli?

6. Bardzo interesujące wydają się również wyniki analiz położenia maksimum emisji fluorescencji zaprezentowane na rys. 19 w konfrontacji z pomiarami wykonanymi techniką DSC i zaprezentowanymi na rys. 23. Jak Doktorant tłumaczy brak reakcji położenia maksimum fluorescencji związku C1 na zmiany temperatury i stężenia, kiedy pochodna C7 reaguje na te czynniki, przy jednoczesnych zmianach wartości temperatury głównego przejścia fazowego dla obydwu tych związków?

Przygotowanie rozprawy doktorskiej w formie książkowej pozwoliło mi na ocenę zdolności edytorskich Autora. Chciałbym podkreślić, że rozprawa jest opracowaniem bardzo starannym i poprawnym zarówno pod względem redakcyjnym jak i graficznym, co sprawia, że pracę czyta się przyjemnie. Zaproponować mógłbym jedynie drobne korekty wyszczególnione poniżej:

1. Str. 17 „...”, bardziej wnikliwą analizę tego układu zaprezentowali Freud i Kuhn” – cytacja nie odnosi się do pracy wspomnianych autorów, a do artykułu przeglądowego.
2. Str. 37, jak należy interpretować zdanie „Można również zauważyć, że zmiana polarności rozpuszczalnika ma stabilizujący wpływ na obecność molekuł w stanie wzbudzonym, przy czym efekt ten silniej zaznacza się w cząsteczce C7”?
3. Str. 39 i dalsze, powtarzające się stwierdzenia „... pasmo około 550 nm” proponuję skorygować do postaci „...pasmo przy około 550 nm”.
4. Str. 50, stwierdzenie „... krócej życiowa” proponuję skorygować do postaci „krótko-życiowa”.
5. Str. 42 i dalsze, fragmenty tekstu rozprawy „... intensywność pasma z pikiem przy 319 nm” oraz „... pasmami na 266 nm” proponuję poprawić do postaci „... intensywność pasma z maksimum przy 319 nm” oraz „... pasmami przy 266 nm”
6. Str. 51, zdanie zapisane w ostatnim wersie odnosi się do wyników dla wybranych wartości pH, co zobrazowano na rys. 13, a nie jak podano na rys. 19. Ta sama uwaga dotyczy str. 61 i wspomnianego tam rys. 22, str. 64 i rys. 24 i 25, str. 65 i rys. 24, str. 67 i wspomnianego tam dwa razy rys. 23 oraz str.86 i rys. 33.
7. Str. 72, co oznacza użyte tam stwierdzenie „... mają wspólną amplitudę drgań”?
8. Str. 76, fragment tekstu „... otrzymano przy niemal stałej długości fali” należy skorygować do postaci „... otrzymano przy niemal stałej wartości liczby falowej”.

W podsumowaniu chciałbym stwierdzić, iż Pan mgr Dariusz Kluczyk przedstawił wartościową rozprawę doktorską, opartą na istotnych wynikach przeprowadzonych przez siebie



badania naukowych. Doktorant jest eksperymentatorem i doskonale czuje się w obszarze badań biofizycznych. W sposób klarowny i precyzyjny opisuje teorię dotyczącą zagadnienia, jak i szczegóły badań wybranymi technikami spektroskopowymi. Osiągnął cele postawione sobie na początku drogi badawczej, a wyszczególnione we wprowadzeniu rozprawy doktorskiej. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Niego dużej wiedzy z zakresu biofizyki oraz umiejętności praktycznych z zakresu preparatyki próbek. Wyniki prac badawczych, powstałych w ramach doktoratu, zostały częściowo opublikowane, wnosząc wiele nowych i cennych z naukowego punktu widzenia informacji, przyczyniających się do zrozumienia oddziaływania wybranych pochodnych tiadiazoli z modelowymi błonami lipidowymi, ich organizacji molekularnej oraz wpływie na efekty spowodowane niedotlenieniem organizmu. W mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie ustawowe oraz zwyczajowe wymagania. Uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej o przyjęcie mojej pozytywnej rekomendacji oraz stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgra Dariusza Kluczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.