



Wrocław, 22.11.2016r.

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

Promotor pracy prof. dr hab. Mariusz Gagoś

W swojej rozprawie doktorskiej mgr Dariusz Kluczyk zajął się badaniem wybranych dwóch związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli w środowiskach o zróżnicowanej polarności oraz w lipidowych błonach modelowych a także badaniami biologicznymi z udziałem zwierząt. Jako główny cel postawił sobie określenie właściwości fizyko-chemicznych w tym organizacji molekularnej pochodnych 1,3,4-tiadiazoli w układach modelowych oraz dokonanie oceny zdolności cytoprotekcyjnych w modelu hipoksji normobarycznej u szczurów. Uważam, że Cel pracy jest adekwatnie sformułowany do zakresu badań, natomiast w przedstawionym na str. 29 rozdziale pt. Cel pracy znalazły się wątki, które posiadają charakter Streszczenia.

Zainteresowanie się związkami z grupy 1,3,4-tiadiazoli przez pracowników Zakładu Biologii Komórki UMCS, którzy opublikowali już rezultaty badań z tej tematyki, wynika z doniesień literatury o tym, że są już stosowane w lecznictwie. Dotyczy to np. sulfametizolu - leku bakteriobójczego, megazolu stosowanego w chorobach pasożytniczych czy metazolamidu pomocnego w leczeniu jaskry. Opisano także potencjalne właściwości farmakologiczne w tym przeciwnowotworowe. Ponadto szerokie możliwości modyfikacji struktury tiadiazoli sprawiły, że są prowadzone intensywne badania nad nimi w poszukiwaniu nowych substancji o obiecujących właściwościach aplikacyjnych. Zsyntetyzowane w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie dwa zróżnicowane strukturalnie związki składają się z pierścienia 1,3,4-tiadiazolu podstawionego, z jednej strony grupą 2,4-dihydroksyfenylową, a z drugiej łańcuchem węglowodorowym o długości odpowiednio jednego (MTDBD, C1) i siedmiu atomów węgla w podstawniku (HTDBD, C7), stały się przedmiotem badań Doktoranta.

Praca ma układ klasyczny i liczy 131 strony. Syntetycznie opisana Część teoretyczna wraz ze Wstępem rozprawy to ok. 15 stron, która składa się z dwóch części. W pierwszej Doktorant omawia chemiczne aspekty budowy cząsteczkowej 1,3,4-tiadiazoli i możliwe funkcje medyczne a w drugiej zagadnienie hipoksji. Szczególne miejsce zajmują między innymi opisy przyczyn stanu niedotlenienia w



płucach, w układzie krążenia oraz w komórkowym łańcuchu oddechowym, mechanizmów adaptacyjnych w niedotlenieniu oraz biochemiczne aspekty odpowiedzi na niedotlenienie. Ten wartościowy fragment opisu teoretycznego dobrze wprowadza w obszar zagadnień łączących się z zaplanowanymi badaniami w układzie modelowym oraz w warunkach *in vivo* opisanych na 75 stronach rozprawy rozdziału pt. Wyniki Badań i Dyskusja. Rozprawa zawiera także Podsumowanie, Wnioski oraz 125 pozycji bibliograficznych, z czego 41% pochodzi z ostatnich 10-ciu lat. Warto podkreślić wartościowy element końcowym rozprawy w formie rozdziału Materiały Uzupełniające, w których Doktorant zamieścił stabelaryzowane informacje, wykazując tendencje zmian indukowanych zarówno epizodem niedotlenienia jak również cytoprotekcyjnym działaniem pochodnej C7 w fizjologicznym procesie.

W części metodycznej rozprawy Doktorant opisuje między innymi stosowane materiały i użyte metody pomiarowe, wyjaśniając sposób i warunki przeprowadzania eksperymentów. Zrealizował swoje zamierzenia stosując szereg metod badawczych i instrumentalnych takich jak: spektroskopie - absorpcyjną i fluorescencyjną z możliwością uzyskiwania widm rezonansowego rozpraszania światła (RLS), spektroskopię w poczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) i dichroizmu kołowego (CD) oraz skaningową mikroskopię różnicową (DSC), co świadczy o bogatym warsztacie Doktoranta. W pierwszym etapie, przygotowując mieszaniny pochodnych C1 i C7 w rozpuszczalnikach o różnej polarności określił wpływ, jaki posiada polarność na właściwości fizyko-chemiczne związków. Badania przeprowadził także w roztworach wodnych o różnym stężeniu jonów wodorowych. W interpretacji zaobserwowanych efektów spektralnych związanych z oddziaływaniem pochodnych z molekułami ośrodka Doktorant postuluje istnienie różnorodnych form molekularnych wynikających ze stopnia agregacji związków C1 i C7 natomiast w przypadku ich roztworów o różnym stężeniu w DMSO wykazuje wyraźny wpływ budowy podstawników węglowodorowych w obu związkach na ich właściwości spektroskopowe. Cennym osiągnięciem jest wyznaczenie poziomów energetycznych form spektralnych pochodnych C1 i C7, czyli dla ich struktur mono- i dimerów a także N-agregatów, jako wyższych form zagregowania. Zarówno sposób uzyskania tych danych jak i same informacje będą ważne dla innych badaczy zajmujących się podobną tematyką. Inny aspekt badań dotyczy odkrycia przez Doktoranta jednoczesnego występowania dwóch pasm emisji fluorescencji przez pochodne C1 i C7. Charakteryzuje przy tym czynniki środowiskowe, w tym zakresy pH i temperatur, konieczne dla występowania tej dualnej emisji fluorescencji oraz ustala, że istotnymi czynnikami modulującymi to zjawisko są procesy agregacyjne,



zależne od długości podstawnika węglowodorowego w cząsteczce 1,3,4-tiadiazolu. Doktorant sugeruje możliwości aplikacyjne pochodnej C7, jako sondy fluorescencyjnej np. w badaniach strukturalnych białek czułych na zmiany temperatury.

Kolejnym etapem są badania molekularnej organizacji związków C1 i C7 w błonach liposomów dipalmitoylocholinyowych (DPPC). Dotyczą one, podobnie jak wcześniej, wyznaczenia przez Doktoranta widm emisji fluorescencji w zależności od stężenia i temperatury, co w przypadku związku C7 w temperaturach poniżej głównego przejścia fazowego DPPC, ujawniło istnienie dwóch pasm emisji fluorescencji i skutkowało zanikiem pasma długofalowego powyżej tej temperatury. Doktorant stwierdza, że zjawisko to wiąże z procesem agregacji molekularnej i obecnością długiego ugrupowania acylowego w cząsteczce C7. Zanik pasma w temperaturach powyżej temperatury głównego przejścia fazowego DPPC w obecności C7 wiąże z deagregacją tego związku, w tym z występowaniem w formie monomerów. Takie wnioskowanie potwierdza rezultatami otrzymanymi w badaniach metodą FTIR. Co więcej stwierdza, że obniżanie T_{max} przejścia fazowego lipidu przez badane pochodne jest wynikiem zwiększania płynności błon liposomowych. Jako bardzo ważne i ciekawe uważam badania spektroskopowe wykonane w podczerwieni, które pozwoliły Doktorantowi na określenie prawdopodobnej różnej lokalizacji pochodnych w dwuwarstwie. Postuluje umiejscowienie cząsteczek pochodnej C1 w polarnym obszarze dwuwarstwy, co wiąże z nieznacznym oddziaływaniem z lipofilowym obszarem błony. Molekuły C7 zdolne są natomiast do silniejszych interakcji zarówno z polarnym jak i lipofilowym rejonem błony liposomów DPPC. Istotność rezultatów uzyskanych na tym etapie badań, a dotycząca wykorzystania dwuwarstwy lipidowej, jako prostego modelu lipidowej frakcji błony biologicznej, stanowić ma zdaniem Doktoranta pomoc w interpretacji wyników badań biologicznych, co starał się potwierdzić w kolejnej części rozprawy.

Do badań biologicznych Doktorant zastosował jedynie pochodną C7, ponieważ w porównaniu z C1 powodowała silniejsze zmiany w właściwościach dynamicznych dwuwarstwy lipidowej. Dla oceny wpływu tej pochodnej na organizm zwierzęcy przeprowadził eksperymenty z wykorzystaniem dwóch metod - spektroskopii fluorescencyjnej i spektroskopii FTIR. Badał próbki homogenatów osocza, serca i nerek otrzymanych po eutanazji 2 miesięcznych szczurów rasy Wistar w modelu hipoksji normobarycznej, którym wstrzyknięto ten związek dootrzewnowo w różnych wariantach stężeń (50



mg/kg m.c.; 100 mg/kg m.c. oraz 2 X 50 mg/kg m.c.). W wyniku przeprowadzonej analizy odpowiednich widm różnicowych intensywności fluorescencji pochodnej C7 w próbkach homogenatów Doktorant wykazał, że związek ten podlega dystrybucji do różnych tkanek, jednak nie jest możliwa dedukcja wskazująca na jej mechanizm. Stwierdza natomiast, że pochodna obecna w poszczególnych tkankach ma możliwość wywierania wpływu na procesy komórkowe. Poziomy zmierzonych intensywności fluorescencji w tkankach były na tyle wysokie, że podkreślił szybkość i jednoznaczność metody wykrycia tego potencjalnego leku metodą spektroskopii fluorescencyjnej, zapewne możliwej do stosowania w analityce medycznej.

Kolejne badania widm homogenatów osocza, serca i nerek z wykorzystaniem metody FTIR, złożonych pod względem znacznej różnorodności sygnałów i często niejednoznacznym pochodzeniu (z uwagi na wzajemne przesunięcia, możliwe nałożenia się różnych drgań w obrębie tego samego pasma i nadbudowania) musiały dostarczyć trudności, z których przy opracowaniu danych Doktorant dobrze wybrnął. Wykazał się przy tym wysokimi zdolnościami i biegłością w identyfikacji poszczególnych fragmentów widm. Muszę przyznać, że miałam kłopot ze śledzeniem informacji (na stronach 86-94, Rys. 27, 28 i 29), które podawał w związku z tą identyfikacją,. Dlaczego nie przedstawił odpowiednich rezultatów w formie trzech paneli z wyodrębnieniem charakterystycznych pasm i zaznaczeniem liczby falowej przypisanej do identyfikowanego maksimum, podobnie jak przejrzyscie to zrobił na Rys. 20 i 21? Doktorant zaproponował następnie analizę zarówno zakresów różnicujących jak również drugich pochodnych sygnałów z tych zakresów. Po wyodrębnieniu dominujących pasm w danym fragmencie widma analizował trzy, następujące zakresy spektralne: lipidowy (od 3000 cm^{-1} do 2800 cm^{-1}), białkowy (od 1800 cm^{-1} do 1280 cm^{-1}) oraz kwasów nukleinowych (od 1300 cm^{-1} do 900 cm^{-1}) oraz wykonał porównania między próbkami zwierząt kontrolnych i po hipoksji oraz kontrolnych i w obecności C7. Histogramy zamieszczone na Rys. 30-37 na użytek rozprawy mogłyby także posiadać oznaczenia liczb falowych ich lub zakresów nad dyskutowaną wartością różnic. Doktorant stwierdza między innymi, że w różnicach w drugich pochodnych poszczególnych grup eksperymentalnych homogenatów osocza widoczne są odchylenia, które nie pojawiają się w przypadku próbek homogenatów serca i nerek, gdzie w niektórych zakresach fragmentów widm korespondowały one ze sobą (dotyczy to w szczególności zakresu $1300\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$, czyli tzw. fingerprint). W tym zakresie spektralnym odchylenia związane z niedotlenieniem powtórzyły się między próbkami z homogenatów serc i nerek w około pięciu



wartościach liczb falowych. Niektóre z nich tłumaczy prawdopodobnym wzrostem ekspresji genów w stanie hipoksji po tym jak na poziomie komórkowym mogły zostać unieczynnione mechanizmy dostosowania się do warunków niedoboru tlenu. W tym przypadku rezultaty otrzymane dla grup zwierząt, którym zaaplikowano związek C7 po epizodzie niedotlenienia wykazują zredukowanie różnic, zależne od dawki potencjalnego leku. Po kolejnych fragmentach analizy porównawczej wyników próbek serc i nerek Doktorant konkluduje, że zaobserwował różny wpływ dawki pochodnej C7 w cofaniu zmian spektralnych towarzyszącej hipoksji. Generalnie wskazuje tendencje/hierarchię efektywności jej działania w tym procesie, twierdząc cyt. „... najkorzystniej prezentowała się jednokrotna dawka 50 mg/kg m.c.. Ocenia, że dobroczynne okazało się stosowanie także dwukrotnej dawki 50 mg/kg m.c., co skutkowało w większości analizowanych zakresów spektralnych w efekty zbliżające je do widma kontrolnego. Dawkę 100 mg/kg m.c. ocenia, że przyniosła najgorsze rezultaty. Dyskutując wyniki zauważa między innymi, że w przypadku, gdy dotyczyły homogenatów serca i nerek nie wykazują po hipoksji wystąpienia takich zjawisk jak apoptoza czy nekroza komórek. Syntetyczne podsumowanie zawarł w końcowym rozdziale rozprawy oraz w dobrze sformułowanych 10-ciu wnioskach dotyczących najistotniejszych jej osiągnięć.

Praca jest starannie opracowana pod względem edytorskim, jednakże Doktorant nie ustrzegł się niezbyt licznych drobnych błędów, tzw. literówek i niepoprawnych stylistycznie sformułowań – przykłady można znaleźć na stronach: 20, 29, 31, 84, 88, 96, 117 i 119. Są też pomyłki lub niedociągnięcia techniczne dla porządku wymienię kilka z nich: str. 81 i 83, omawiany jest Rys. 24 a nie Rys. 30; str. 83 - brakuje na Rys. 30 oznaczenia paneli (A,B,C); str. 95 i 96 - pomyłkowo podano Rys. 36 zamiast Rys. 30; str. 82, Rys.24 na którym oznaczono długości maksimów 410 i 436 nm w omówieniu podaje 408 i 436; str. 101 - w podpisie pod rysunkiem 101 brakuje słowa „serc”; str. 123 – podpis Tabeli 5 – pomyłkowy, pod Tabelami brakuje legendy. Podkreślam, że wymienione przykłady usterek rozprawy nie mają wpływu na moją jej wysoką ocenę. Proszę Doktoranta, aby odpowiedział/wyjaśnił mi na następujące pytania: 1) Jak liczne były grupy zwierząt (szczurów) i aby podał trochę detali dotyczących pobierania homogenatów poszczególnych tkanek i jaki mógł mieć wpływ na rezultaty badań fakt, że przygotowanie próbek z homogenatów odbywało się z 20 minutową procedurą wirowania w normalnej atmosferze? 2) Jak przedstawiała się statystyka poszczególnych pomiarów? 3) Które efekty przypisane cytoprotekcyjnemu działaniu pochodnej C7 na komórki homogenatów bądź osocza wymieniłby, jako



najistotniejsze oraz czy metodę FTIR poleciłby do stosowania w diagnostyce medycznej, jako użyteczną, czy może uzupełniającą lub jedynie, jako metodę badawczą?

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Moim zdaniem wykonane badania - pomiary oraz uzyskane wyniki i ich interpretacja spełniają zamierzone cele naukowe. Otrzymane wyniki są wartościowe nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale również z potencjalnie aplikacyjnego. Doktorant zastosował długi szereg metod, którymi biegle się posługiwał. Wspomnę, że przedstawione w rozprawie osiągnięcia zostały już w większej części opublikowane w formie 4 oryginalnych artykułów z listy A czasopism MNiSZW, co dobrze świadczy o ich wartości oraz uświadamia, że przeszły już pozytywne recenzje. Łączny współczynnik oddziaływania prac wynosi $IF=8,20$ sumaryczna liczba punktów MNiSZW = 95, liczba współautorów – 9. Przedstawiona praca Pana mgr Dariusza Kluczyka spełnia wszelkie wymagania ustawowe określone w art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw nr. 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i dlatego wnioskuję do wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Dariusza Kluczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o rozpatrzenie możliwości jej wyróżnienia.

Jaruna Gabnelsha