

Łódź, 4.09.2026 r.

dr hab. Anita Krokosz, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Agnieszki Stepasiuk-Stańko**

p.t. „*Fluorescencyjne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny - synteza, charakterystyka fotofizyczna i ocena aktywności biologicznej*”

wykonanej w Katedrze Chemii Biomedycznej

Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Wiesława Wiczka

i promotor pomocniczej: dr inż. Ireny Bylińskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Chemii Biomedycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Celem pracy było zaprojektowanie, synteza z wykorzystaniem reakcji Sonogashiry-Hagihary oraz określenie właściwości otrzymanych, nowych znaczników fluorescencyjnych zawierających szkielet tyrozyny, w tym wstępna ocena znaczenia biologicznego zsyntezowanych związków poprzez charakterystykę ich oddziaływania z modelowymi błonami lipidowymi, zdolności do przenikania do komórek oraz wpływu na żywotność komórek.

Rozprawa została przygotowana jako monografia i ma typową dla prac doświadczalnych konstrukcję. Podane są założenia i cel pracy, zastosowane metody badawcze, szczegółowo opisane wyniki doświadczeń, podsumowanie wyników i wnioski, streszczenia pracy w jęz. polskim i angielskim, spisy tabel, rycin, wykorzystanych skrótów, spis piśmiennictwa oraz dorobek naukowy. Rozprawę otwiera niezwykle rozbudowana część teoretyczna wprowadzająca czytelnika w zagadnienia związane ze zjawiskiem fluorescencji, znaczników fluorescencyjnych i ich biologicznych zastosowań oraz przeprowadzania reakcji

Sonogashiry-Hagihary. Moim zdaniem część ta jest zbyt długa i zawiera nadmiarowe i powtórzone informacje, np. na jednej stronie trzykrotnie powtórzono definicję czasu zaniku fluorescencji. Prosiłabym też o wyjaśnienie konieczności szczegółowego opisu syntezy Pery-DHTP-BZ-COP użytego do detekcji jonów Pb(II) i 2,4,6-trinitrofenolu. Czy zastosowano tutaj np. modyfikację reakcji Sonogashiry-Hagihary, która byłaby użyteczna w prowadzonych w pracy syntezach?

Skoro podajemy szczegółowe informacje dotyczące konkretnej syntezy lub układu byłoby wskazane podkreślenie w jaki sposób informacje te są użyteczne dla części doświadczalnej. Zadaniem części teoretycznej jest wprowadzenie czytelnika w jak najlepsze zrozumienie części doświadczalnej.

Moim zdaniem celem pracy było określenie możliwości wykorzystania w badaniach biomedycznych nowo zaprojektowanych i zsyntezowanych znaczników fluorescencyjnych zawierających szkielet tyrozyny. Podany cel, czyli „projektowanie, synteza oraz badanie właściwości nowych znaczników fluorescencyjnych zawierających szkielet tyrozyny” nie wskazuje po co to robimy, a Doktorantka w dalszej części rozdziału „Cel pracy” pisze o określeniu potencjału aplikacyjnego otrzymanych znaczników fluorescencyjnych. Uważam także, że ostatni akapit tego rozdziału jest zbędny i zawiera powtórzenie informacji zamieszczonych już wcześniej.

W części doświadczalnej Doktorantka szczegółowo opisuje przeprowadzone syntezy symetrycznych i asymetrycznych pochodnych tyrozyny oraz ich charakterystykę spektroskopową i biologiczną. Jestem pod wrażeniem ogromu pracy, jaką Doktorantka włożyła w realizację przedstawionych w rozprawie badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki zakres badań biologicznych, który świadczy o interdyscyplinarnym charakterze Jej pracy oraz o gotowości do poszerzania własnych kompetencji i zainteresowań badawczych.

Istotną wartością rozprawy jest również aplikacyjny potencjał uzyskanych wyników. Mam nadzieję, że rezultaty przedstawione w rozprawie znajdą odzwierciedlenie w publikacjach naukowych lub staną się podstawą do opracowania rozwiązań o charakterze patentowym.

Na szczególne podkreślenie zasługuje przeprowadzona przez Doktorantkę ocena zachowania otrzymanych znaczników fluorescencyjnych w układach istotnych z punktu widzenia chemii biomedycznej. Obejmowała ona zarówno standardową ocenę cytotoksyczności z zastosowaniem testu MTT, jak i bardziej rozbudowane badania dotyczące oddziaływania znaczników z błonami oraz ich przenikania do komórek. Test MTT, powszechnie stosowany jako podstawowe narzędzie oceny cytotoksyczności nowych związków rozważanych pod kątem potencjalnych zastosowań biologicznych lub medycznych, wykonano dla wszystkich otrzymanych znaczników z wyjątkiem dwóch związków, których niska wydajność syntezy nie pozwoliła na uzyskanie ilości materiału wystarczającej do przeprowadzenia badania.

Szczególnie wartościowym elementem pracy są natomiast badania z wykorzystaniem liposomów LUV i GUV jako modeli błon komórkowych. Pozwoliły one ocenić zdolność otrzymanych znaczników do oddziaływania z warstwą lipidową, przenikania przez modelowe błony oraz ich stabilność w tych układach. Badania te zostały następnie uzupełnione eksperymentami na linii komórkowej MCF-7, umożliwiającymi ocenę zdolności znaczników do wnikania do komórek. Zestawienie wyników uzyskanych w modelowych układach błonowych z obserwacjami w rzeczywistym układzie komórkowym stanowi cenne rozszerzenie charakterystyki otrzymanych związków. Takie wielopoziomowe podejście, łączące charakterystykę chemiczną i fotofizyczną z oceną zachowania badanych związków w modelach błonowych oraz w komórkach, jest szczególnie adekwatne do problematyki chemii biomedycznej i zwiększa znaczenie aplikacyjne przedstawionych wyników.

Pewien niedosyt pozostawia stosunkowo skromna dyskusja uzyskanych wyników. Jest ona prowadzona w ramach rozdziałów poświęconych wynikom i ich dyskusji, a całość zostaje następnie ujęta w rozdziale „Podsumowanie”. W mojej ocenie zabrakło jednak pogłębionej próby wyjaśnienia obserwowanych zależności oraz uzasadnienia, dlaczego do badań wybrano właśnie takie, a nie inne podstawniki.

Stwierdzenie, że „wydajność kwantowa asymetrycznych i symetrycznych pochodnych jest zróżnicowana i zależna od użytego podstawnika, jak i otoczenia pomiarowego”, jest wprawdzie prawdziwe, ale samo w sobie ma charakter dość oczywisty i nie wyjaśnia przyczyn

obserwowanych różnic. Warto byłoby podjąć próbę powiązania właściwości fotofizycznych otrzymanych związków z ich budową chemiczną, w szczególności z charakterem elektronowym zastosowanych podstawników, stopniem i rozległością sprzężenia π , możliwością delokalizacji elektronowej oraz efektami sterycznymi.

Interesujące byłoby również wyjaśnienie obserwowanych różnic w zależności od środowiska pomiarowego. Dlaczego dla związku Tyr(acPh-O-Ph) w PBS obserwuje się największe przesunięcie batochromowe w widmie absorpcji UV-Vis, podczas gdy w widmach emisji fluorescencji największe przesunięcie w kierunku dłuższych fal obserwuje się dla Tyr(acPh-4-NO₂) w metanolu, w porównaniu z BocTyrOMe, stanowiącym wyjściowy „szkielet” poddawany modyfikacjom?

Piśmiennictwo zostało dobrane odpowiednio do tematyki rozprawy, a wśród cytowanych publikacji przeważają prace oryginalne, co świadczy o ciekawości naukowej Doktorantki i Jej zainteresowaniu aktualnym stanem badań w tej dziedzinie.

Mam też kilka uwag dotyczących sfery edytorskiej rozprawy.

W wykazie stosowanych skrótów i symboli Doktorantka określa skład PBS podając końcowe stężenia jego składników i dodaje „stężenia przeliczone na 1 litr roztworu PBS”. Stężenie nie zależy od objętości ani masy roztworu, więc ta uwaga jest niepotrzebna, a wręcz błędna ponieważ sugeruje, że dla innej objętości stężenia będą inne.

W spisie literatury w dużej części cytowań brak nr stron lub ID artykułu. Podano tylko rok i nr woluminu. Pozycja 149 i 154 to ten sam artykuł przeglądowy.

Moim zdaniem, niektóre sformułowania w pracy są niezbyt fortunne lub zastosowano żargon laboratoryjny. Jest też kilka literówek. Kilka przykładów takich sformułowań: „mimikować właściwości fluoresceiny”, „stężenie komórek”, „makrofagów związanych z przerzutami w przedklinicznym modelu przerzutów do płuc” – przerzutów czego?

Występują też przestawienia liter, np. DNTB zamiast DTNB, Burker zamiast Bruker, Dioses zamiast Diode, Hoest zamiast Hoechst, zapewne 33342, ponieważ dobrze przenika przez błonę komórkową, ale nie podano konkretnej nazwy znacznika. Pojawia się powszechna „kalka” z języka angielskiego „wobec komórek zdrowych” - komórki mogą być prawidłowe, nie zdrowe.

Opisy metod nie zawsze są wyczerpujące. Podano w rozdziale 6.2, że „kuwety wykorzystane do badania widm emisji przygotowałam poprzez pokrycie ich powierzchni BSA (ang. *Bovine Serum Albumin*, 2 mg/ml)” i nic więcej. Nie podano, czy sprawdzono, że adsorpcja BSA na powierzchni kuwety nie miała wpływu na uzyskane wyniki.

Na zdjęciach mikroskopowych brakuje podziałki (scale bar), która powinna być na zdjęciu. Podanie w opisie tylko rozmiaru zdjęcia nie jest wystarczające.

Zwraca uwagę również fakt, że część metodyczna została wyodrębniona w części chemicznej, natomiast w części biologicznej opis metod zamieszczono w tym samym rozdziale co wyniki i ich dyskusję. Taki układ utrudnia lekturę oraz jednoznaczne rozróżnienie, czy w celu uzyskania przedstawionych wyników zastosowano standardowe, powszechnie przyjęte metody, czy też metody te zostały przez Doktorantkę zmodyfikowane, a opracowanie tych modyfikacji stanowi również istotny element i osiągnięcie przedstawione w rozprawie.

Wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie reprezentowanej dyscypliny naukowej.

Zastosowane metody badawcze umożliwiły realizację celu pracy. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę w zakresie znaczników fluorescencyjnych bazujących na pochodnych tyrozyny z potencjałem aplikacyjnym w naukach biologicznych i medycznych.

Przedstawione w recenzji uwagi nie wpływają na moją ogólną **pozytywną** ocenę rozprawy.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Agnieszki Stepasiuk-Stańko spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Stepasiuk-Stańko do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.