

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Stepasiuk-Stańko

Pani mgr Agnieszka Stepasiuk-Stańko przedstawiła do oceny Rozprawę zatytułowaną: „*Fluorescencyjne analogi aminokwasów niebiałkowych z fragmentem tyrozyny – synteza, charakterystyka fotofizyczna i ocena aktywności biologicznej*” wykonaną w Katedrze Chemii Biomedycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką promotora prof. dr hab. Wiesława Wiczka i promotora pomocniczego dr.inż. Ireny Bylińskiej.

Autorka podjęła się realizacji ambitnego celu, jakim jest synteza kilkunastu nowych aminokwasów niebiałkowych z wykorzystaniem tyrozyny i zbadanie ich własności pod kątem potencjalnych zastosowań jako fluoroforów w badaniach medycznych. Warto podkreślić, że różnorodne badania nad samą tyroziną i jej pochodnymi były z powodzeniem zainicjowane na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego około 30 lat temu, przez promotora tego doktoratu - profesora Wiesława Wiczka.

Rozprawa składa się ze strony tytułowej, spisu treści, streszczenia (w językach polskim i angielskim) oraz głównych rozdziałów zatytułowanych: *Część teoretyczna* (I, 44 strony), *Cel pracy* (II, 3 strony), *Część doświadczalna* (III, 118 stron), *Podsumowanie i wnioski* (IV, 5 stron). Na końcu pracy znajdujemy wykazy: dorobku naukowego Doktorantki (V), rysunków (VI, 190 opisów), tabel (VII, 7 opisów) oraz 181 odnośników literaturowych (VIII).

Rozdział I może budzić zastrzeżenia ze względu na nieuzasadnione użycie przymiotnika *teoretyczna* w tytule. Jest to bowiem dość obszerny wstęp (7 podrozdziałów) w którym prezentacje modeli teoretycznych są zdominowane przez opisy wyników doświadczalnych. Pierwsze dwa podrozdziały traktują o spektroskopii fluorescencyjnej, w tym o diagramie Jabłońskiego, przesunięciu Stokesa, spektroskopii rozdzielczej w czasie (czasy życia fluorescencji, mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem techniki FLIM). Podrozdziały 3 i 4 dotyczą wpływu środowiska na właściwości spektralne i fotofizyczne (solvatochromia, wpływ temperatury i lepkości) a także sposobów wygaszania fluorescencji. Autorka wykorzystała tu w dużym stopniu (około 30 odniesień) świetną monografię Josepha R. Lakowicza *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Rozważania teoretyczne ilustruje odpowiednio dobranymi faktami doświadczalnymi, jednak w pozostałych 3 podrozdziałach *Części teoretycznej*, traktujących o znacznikach fluorescencyjnych (tzw. zewnętrznych oraz bazujących na strukturze aminokwasów białkowych) oraz reakcji Sonogashiry-Hagihary, przedstawiono wyłącznie wyniki eksperymentów. Rozdział I, z zastrzeżeniem co do nazwy, jest tym nie mniej dobrym wprowadzeniem umożliwiającym zrozumienie wagi wyznaczonego celu pracy i sposobów jego realizacji. W wielu miejscach tego wstępu, w szczególności na końcu str. 44, Autorka pisze o poszukiwaniu nowych znakowanych fluorescencyjnie terapeutyków. Szkoda, że nie odnosi się tutaj do ważnej pracy z własnego dorobku publikacyjnego (na str.178), traktującej o nowych znakowanych izotiocyanianach – związkach o własnościach teranostycznych w zwalczaniu nowotworów.

Autorka samodzielnie zsyntetyzowała 10 asymetrycznie podstawionych pochodnych tyrozyny oraz 6 odpowiednich symetrycznie podstawionych związków. Dodatkowo wykorzystała w badaniach 3 symetrycznie podstawione pochodne, których syntezy

wykonano na Uniwersytecie Gdańskim w ramach pracy licencjackiej (Tyr(acPh)₂) oraz pracy magisterskiej (Tyr(acPh-4-CHO)₂ i Tyr(acPh-O-Ph)₂). W rezultacie Autorka mogła porównać własności dla 8 par pochodnych (asymetrycznie i odpowiednio symetrycznie podstawionych). Szkoda, że z porównania wypadły 2 pary: Tyr(acPir)/Tyr(acPir)₂ oraz Tyr(acPhacDMA)/Tyr(acPhacDMA)₂. Synteza Tyr(acPir) została opisana w podrozdziale 2.3.4 wraz z potwierdzeniem identyfikacji analizą masową. Zabrakło jednak uwagi, że otrzymana ilość tego związku nie była wystarczająca do badań nawet tak czułych jak spektroskopia fluorescencyjna. Dowiadujemy się o tym pośrednio dopiero na str.136 przy opisie fotostabilności. Nie jest też jasne, dlaczego nie zsyntetyzowano Tyr(acPhacDMA)₂ (w celu porównania z zsyntetyzowaną asymetryczną pochodną Tyr(acPhacDMA)). Spowodowało to zubożenie badań (o 2 pary) i utrudniło odpowiednie porównania własności spektroskopowych.

Autorka dywersyfikowała cechy elektronowo-donorowe i elektronowo-akceptorowe wprowadzanych podstawników, aby maksymalnie różnicować ich wpływ na spektroskopię i fotofizykę pochodnych tyrozyny. Obszerne badania (pomiar widm absorpcji, fluorescencji i wzbudzenia fluorescencji, a także pomiary wydajności kwantowej fluorescencji i czasów życia) wykonano dla kilkunastu związków rozpuszczając je w rozpuszczalnikach o rozmaitych polarnościach: acetonitrylu, metanolu, cykloheksanie i buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS). Takie podejście dawało możliwość oceny przydatności badanych pochodnych jako fluoroforów i wyboru spośród nich związków najbardziej obiecujących do badań biologicznych. Biorąc pod uwagę parametr jasności (wyrażony przez iloczyn współczynnika ekstynkcji i wydajności kwantowej fluorescencji) stosowany do oceny użyteczności związku chemicznego jako chromoforu i fluoroforu, należy uznać, że Pani mgr Agnieszka Stepasiuk-Stańko odniosła znaczący sukces. Kilka z uzyskanych nowych pochodnych tyrozyny osiąga wartości w przedziale 50 000 -100 000, porównywalne z jasnością komercyjnie dostępnych znaczników fluorescencyjnych, takich jak: BODIPY-FL (86 000), fluoresceina (88 000) i rodamina 110 (68 000).

Niewątpliwie dużym wyzwaniem w realizacji założonego celu były badania fotostabilności, a także ustalenie zależności absorpcji i emisji wybranych fluoroforów od pH roztworów wodnych oraz od obecności reduktorów i utleniaczy. Dla wyselekcjonowanych cząsteczek Doktorantka odnotowała bardzo korzystne właściwości: mały wpływ kwasowości roztworu na widma, niewrażliwość na utleniacze i reduktory oraz wysoką fotochemiczną odporność.

Pracę wieńczyły zaawansowane badania biologiczne. Autorka śledziła wpływ obecności asymetrycznie i symetrycznie podstawionych fluoroforów na żywotność wybranych ludzkich linii komórkowych: keratynocytów (HaCaT) oraz komórek nowotworowych piersi (MCF-7) i prostaty (PC-3). Wyniki są obiecujące. Dla większości asymetrycznie i symetrycznie podstawionych pochodnych tyrozyny nie następowała wyraźna zmiana żywotności analizowanych komórek.

Z punktu widzenia znakowania tkanek ważne jest przenikanie potencjalnych markerów poprzez błony komórkowe. W pracy podjęto takie badania dla komórek MCF-7 i sześciu pochodnych tyrozyny (czterech podstawionych symetrycznie, dwóch asymetrycznie). Doktorantka wykorzystwała w tym celu konfokalny mikroskop fluorescencyjny z techniką FLIM. Tylko dla symetrycznie podstawionych pochodnych uzyskała obrazy świadczące o preferencyjnym gromadzeniu się fluoryzujących molekuł w obszarze błon komórkowych MCF-7. Jak zaznaczyła, te wstępne wyniki wymagają dalszego potwierdzenia.

W trakcie lektury odnotowałem stosunkowo mało błędów redaktorskich, literówek lub niejasnych/niezręcznych sformułowań. Oto przykłady:

str.11, wiersz (w) 14 od góry (g)..George Stokes opisał zjawisko przesunięcia Stokesa!
str.18, w1 od dołu (d)....podstawienie H₂O przez D₂O....
str.20, w5g.... ν_A -długość fali absorpcji [cm⁻¹] !!, podobnie.... ν_F -długość fali.....
str.21 w2g....prowadzi do wyników przybliżonych lub odbiegających.....
str.24 w8g....(FRET) jest jedynym z procesów.....
str.25 w5g....sprężenie spin-orbital lub.....
str.40 w10g....przesunięcie Stokesa (do 62500 cm⁻¹ !!).....
str.46 w2g....prowadzi ją się.....
str.45-51 często powtarzaną nazwę: reakcja Sonogashiry-Hagihary...dobrze byłoby zastąpić skrótem S-H
str.58 w6g, w9g....spektrometr Burker Daltonics.....
str.96 w11dpochodnej asymetrycznej zwierającej
rys.174-179Przestawiono wartość SEM

Zauważone uchybienia są drobne i nie wpływają na moją ocenę, że wykonana praca doświadczalna jest wartościowa i dobrze opisana w Rozprawie. Autorka przeprowadziła kilkanaście syntez wykorzystując mechanizm reakcji Sonogashiry-Hagihary (natrafiając jednak czasami na trudności związane z małą wydajnością). Dla każdej pochodnej uzyskała analizę masową i widmo NMR. Następnie, badania kilkunastu związków w kilku rozpuszczalnikach przełożyły się na imponujący zbiór danych spektroskopowych, który został udostępniony w formie starannych rysunków i czytelnych tabel. Dyskusja tych wyników – tj. widm absorpcji, fluorescencji i wzbudzenia fluorescencji, czasów życia i wydajności kwantowej fluorescencji acetylenowych pochodnych tyrozyny - jest przekonująca. Wreszcie, realizując trudne i czasochłonne badania oddziaływań pochodnych tyrozyny z materiałem biologicznym, Autorka zrealizowała w pełni cel swojego doktoratu obejmujący „projektowanie, syntezę oraz badanie właściwości nowych znaczników fluorescencyjnych zawierających szkielet tyrozyny”

Podsumowując, uważam, że przedłożona do oceny dysertacja mgr Agnieszki Stepasiuk-Stańko spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2024 r. poz.1571, z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agnieszki Stepasiuk-Stańko do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



prof. dr hab. Jerzy Sepioł