

prof. dr hab. Janusz Rak

Gdańsk, 23 grudnia 2024 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Kamila Frąckowiaka zatytułowanej ”Od aminokwasów do białka – badanie wpływu fotoutleniania aminokwasów na modelowe białko”

Chociaż światło jest niezbędne do życia, od dawna zdawano sobie sprawę również z niekorzystnego działania na organizm ludzki fotonów, szczególnie z zakresu UV. Wystarczy w tym miejscu wymienić dobrze znane uszkodzenie DNA – fotodimer tymidyny – powstające w wyniku ekspozycji materiału genetycznego na promieniowanie z zakresu UVB, docierające w pewnej ilości na Ziemię. To niekorzystne działanie światła można jednak wykorzystać, stosując je do usuwania zmian nowotworowych, w szczególności powierzchniowych. Wykorzystujemy tutaj tzw. terapię fotodynamiczną (PDT), w której miejscowo zogniskowana wiązka fotonów może w obecności fotouczulacza prowadzić do śmierci komórkowej, a tym samym wyeliminowania zmutowanych komórek. Praktycznie wykorzystywana terapia fotodynamiczna opiera się na świetle czerwonym/podczerwonym ze względu na wysoką przepuszczalność skóry dla tego typu promieniowania. W tym zakresie widmowym wykorzystuje się tzw. mechanizm typu II terapii fotodynamicznej tj. generowanie wysoce cytotoksycznego tlenu singletowego, powstającego na skutek transferu energii z elektronowo wzbudzonego fotosensybilizatora. Należy sobie jednak uzmysłowić, że większość guzów znajduje się w stanie hipoksji, co uniemożliwia wykorzystanie mechanizmu II. Kontynuując tą myśl i biorąc pod uwagę fakt, że zakres stosowania terapii fotodynamicznej uległ znacznemu poszerzeniu poprzez użycie światłowodów, które mogą doprowadzić fotony wzbudzające fotosensybilizator do w zasadzie każdego organu, można dojść do wniosku, że dalszy rozwój tej metody leczniczej powinien skupiać się na stosowaniu terapii fotodynamicznej w warunkach beztlenowych.

Powyższe wprowadzenie pokazuje więc, że praca doktorska mgra Kamila Frąckowiaka, opisująca sensybilizowane fotoutlenianie aminokwasów aromatycznych w roztworze oraz w wybranym białku wpisuje się doskonale w aktualny nurt badań nad ważnym tak z poznawczego, jak

i praktycznego punktu widzenia problemem. Doktorant wykonał badania w Zakładzie Chemii Fizycznej i Fotochemii pod kierunkiem prof. Marciniaka jako promotora i dr Ignasiak-Kciuk jako promotora pomocniczego. Pierwszym elementem koniecznym do odniesienia sukcesu na drodze do uzyskania stopnia doktora wydaje się wybór zespołu, w którym później prowadzi się badania naukowe. Niewątpliwie Doktorant dokonał niezwykle trafnego wyboru, decydując się na pracę w światowej klasy grupie naukowej, prowadzącej badania nad fotochemią, fotofizyką i chemią radiacyjną ważnych biologicznie związków, ze szczególnym uwzględnieniem reakcji fotoindukowanych związanych z przeniesieniem elektronu, atomu wodoru czy fotoizomeryzacją.

Dysertacja, napisana w języku angielskim, przygotowana została w formie zwyczajowej. Dokument liczy 200 stron, które obejmują: stronę tytułową (w języku polskim i angielskim), podziękowania (w języku angielskim), streszczenie (w języku polskim i angielskim) – sumarycznie 12 stron, spis treści (2 strony), wykaz stosowanych skrótów (2 strony), część literaturową odnoszącą się do istoty podjętego tematu badań, bezpośredniego i sensybilizowanego fotoutleniania z uwzględnieniem mechanizmów fotosensybilizacji, stanu wiedzy dotyczącego dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jako enzymu posiadającego w centrum aktywnym aminokwasy aromatyczne, fotoindukowanego procesu utlenienia łańcuchów bocznych aminokwasów oraz szczegółów tego procesu w poszczególnych aromatycznych aminokwasach (22,5 strony), cel pracy (0,5 strony), opis materiałów i metod badań (19 stron), wyniki badań i dyskusję (63), na którą składają się podrozdziały dotyczące fotosensybilizowanego utleniania tyrozyny, tryptofanu, histydyny i fenyloalaniny w roztworze, a także powstawania stabilnych produktów fotoutleniania tych aminokwasów w modelowym białku.

Rozprawę kończy rozdział zatytułowany „Conclusions” (7 stron) oraz bibliografia (13 stron). Do pracy dodano suplement (59 stron) zawierający warunki rozdziałów gradientowych, widma fragmentacyjne (MS/MS) stabilnych produktów fotoutleniania badanych aminokwasów oraz lizatów białka, jak również widma i zaniki absorpcji przejściowej, wykresy Sterna-Volmera, profile czasowe dla indywidualnych przejściowych oraz krzywe kalibracyjne. Tekst zawierający 178 odsyłacze literaturowe i 16 tabel zilustrowano przy pomocy 68 rysunków. Układ pracy należy do klasycznych i nie budzi zastrzeżeń. Rysunki, jak zresztą cała praca, przygotowane są na dobrym poziomie technicznym. Autor nie ustrzegł się przed kilkoma błędami typograficznymi i niezręcznościami

językowymi wpływającymi na jasność przekazu. Żeby nie być gołosłownym poniżej przytaczam dwa przykłady tego typu usterek:

Strona 18: “In the various processes involved in maintaining homeostasis in living cell, encompassing ROS or reactive nitrogen species (RNS) [9–12], along with more indirect forms of oxidants, such as the excited triplet states of sensitizers”. Zdanie to wydaje się niedokończone. Autor chciał prawdopodobnie wyrazić następującą myśl: „In the various processes involved in maintaining homeostasis in living cells, reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) [9–12], along with more indirect forms of oxidants such as the excited triplet states of sensitizers, play a significant role”.

- Strona 24: “glyceralderhyde-3-phosphate” zamiast “glyceraldehyde-3-phosphate”.

Część literaturowa doktoratu stanowi sekwencję rozdziałów przygotowujących czytelnika do lektury zasadniczego fragmentu dysertacji. Poza wprowadzeniem do tematyki pracy i rekapitulacji podstawowej wiedzy na temat procesów fotosensybilizowanych, Kandydat omówił wcześniejsze badania dotyczące mechanizmów sensybilizowanych światłem reakcji chemicznych w łańcuchach bocznych aminokwasów takich jak cysteina, cystyna, metionina, tyrozyna, tryptofan, histydyna czy fenyloalanina oraz podsumował stan wiedzy dotyczący wybranych właściwości biologicznych i podatności na stres oksydacyjny dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego.

Z kolei w części dyskusyjnej rozprawy mgr Frąckowiak przedstawił wyniki badań własnych nad fotosensybilizowanym utlenianiem aminokwasów aromatycznych w roztworze oraz pełniących rolę reszt w białku GADPH. Stąd konstrukcja części referatowej doktoratu doskonale konweniuje z częścią zasadniczą rozprawy, ułatwiając czytelnikowi zrozumienie interpretacji skomplikowanych procesów fotochemicznych badanych w ramach ocenianej pracy doktorskiej.

Część dyskusyjną dysertacji poprzedza rozdział opisujący zastosowane materiały i metodologię. Rozdział ten, podobnie jak część referatowa, dobrze odpowiada treści fragmentu zasadniczego pracy, pozwalając śledzić przeprowadzone rozumowania. Poza źródłami, z których pozyskano modelowe związki, test na aktywność GADPH oraz inne odczynniki konieczne do przeprowadzenia badań, Kandydat scharakteryzował metody, głównie spektroskopowe (HPLC, LCMS, UV-vis) zastosowane do scharakteryzowania trwałych produktów utlenienia aminokwasów, jak i metodę laserowej fotolizy błyskowej umożliwiającą zbadanie mechanizmu

fotosensybilizowanego utleniania badanych indywidualów. Ta część pracy wydaje się nieco zbyt rozbudowana w niektórych jej fragmentach. Na przykład zamieszczenie zdjęcia pokazującego wysokosprawy chromatogram cieczowy (rysunek II.5), a także detaliczne omówienie działania spektrometrii mas mijają się z celem, gdyż jest to dzisiaj wiedza powszechna.

W części zasadniczej rozprawy Doktorant bada sensybilizowane 3-karboksybenzofenonem (3CB) fotoutlenianie czterech aminokwasów, tyrozyny, tryptofanu, histydy, fenyloalaniny, i ich pochodnych w roztworze. Każdy z podrozdziałów poświęconych tym indywidualom dzieli się na dwie części opisujące odpowiednio wyniki uzyskane przy pomocy fotolizy stacjonarnej i fotolizy błyskowej. Zastosowanie spektrometrii mas do otrzymanych fotolitów pozwala na identyfikację trwałych produktów fotoutleniania, a wraz z pomiarami czasowo-rozdzielczymi umożliwia zaproponowanie mechanizmów reakcji fotosensybilizowanych.

Wyniki opisane w części dyskusyjnej rozprawy zostały opublikowane w tym roku w dwóch czasopismach chemicznych: *Free Radical Biology and Medicine* oraz *Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*. W obydwu pracach mgr Frąckowiak pełni rolę pierwszego współautora, co podkreśla Jego wiodącą rolę w realizacji badań. Ze względu na zrecenzowanie na etapie publikowania wyników przedstawionych w dysertacji przez przynajmniej 4 recenzentów moja rola sprowadza się przede wszystkim do stwierdzenia zgodności przedstawionej do oceny rozprawy z wymogami ustawowymi. Ponieważ jednak recenzent musi być odpowiednio krytyczny, pozwolę sobie w tym miejscu na sformułowanie kilku pytań/komentarzy, które nasunęły mi się w trakcie czytania niniejszej rozprawy:

- We wstępie do pracy doktorskiej Kandydat stwierdza: „Raab's mentor, von Tappeiner, later continued this discovery, leading to the development of the first form of photodynamic therapy in 1904” (str. 17), a w dalszej części rozprawy pisze o typie I i II reakcji fotosensybilizowanych, wyróżnianych najczęściej przy okazji rozważań nad terapią fotodynamiczną. Podjęcie szczegółowych problemów sformułowanych przez Kandydata sugeruje chęć poszerzenia naszej wiedzy w kontekście metody PDT. Przy czym terapia fotodynamiczna ma najczęściej na celu wyeliminowanie komórek zmienionych chorobowo (np. nowotworowych). Czy rzeczywiście sensybilizowane uszkodzenia białek stanowi główny mechanizm działania PDT?

- Kandydat bada procesy fotoutleniania aminokwasów aromatycznych i GADPH sensybilizowanych 3-karboksybenzofenonem w warunkach beztlenowych. Doktorant kilkakrotnie podkreślił, że badania fotoutleniania aminokwasów w warunkach beztlenowych są w literaturze fachowej traktowane po macoszemu (co, między innymi, stało się przyczynkiem do podjęcia badań opisanych w doktoracie) ze względu na normoksję panującą w komórkach żywych. A zatem czy model badany w pracy odpowiada jakiejś rzeczywistej sytuacji w komórce? Czy i jakie może być znaczenie przedstawionych badań dla fotobiologii?

- Na str. 20 Doktorant pisze: „The direct oxidation of proteins, peptides, and amino acids by UV light is only significantly relevant if the light is absorbed by the protein (i.e. the wavelength is below 320 nm)”. Czy tego typu sytuacja, tzn. absorpcja światła z zakresu UVB (280-320 nm) nie zdarza się w przypadku organizmów żywych?

Reasumując stwierdzam, że Doktorant w pełni zrealizował zamierzone cele badawcze. Wymienione wyżej uwagi krytyczne/komentarze nie umniejszają osiągnięć Autora. Recenzent nie ma wątpliwości, że pracę napisała osoba znająca dogłębnie eksplorowany temat, biegle posługująca się stacjonarną i impulsową fotolizą laserową oraz spektrometrią mas. Dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób dojrzały. Pan Frąckowiak wykazał się umiejętnością krytycznej oceny własnych rezultatów, jak również sprawnością w formułowaniu uzasadnionych wniosków.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera istotne elementy nowości naukowej i spełnia wszystkie ustawowe oraz zwyczajowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Kamila Frąckowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysokie walory naukowe dysertacji oraz fakt spełnienia przez nią wszystkich wymogów określonych w regulaminie wyróżnienie rozpraw doktorskich obronionych na Wydziale Chemii UAM, proponuję wyróżnić niniejszą pracę doktorską w stosowny sposób.

prof. dr hab. Janusz Rak

/-/

(podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym)