



UNIERSYTET GDAŃSKI



Prof. dr hab.
Wiesław Wiczak
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 01.06.2015

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Mateusza Gierszewskiego pod tytułem
„Spektroskopia i fotofizyka pochodnych 5-deazaalloksazyny. Ujęcie eksperymentalne i
teoretyczne”

Flawiny oraz produkty ich rozkładu w komórkach organizmów żywych pełnią istotne i różnorodne funkcje. Wystarczy wspomnieć, iż nukleotydy flawinowe są koenzymami flawoenzymów katalizujących procesy oksydacyjno-redukcyjne w metabolizmie cukrów, aminokwasów, kwasów tłuszczowych, zasad purynowych i w łańcuchu oddechowym. 5-Deazaflawiny, chociaż mniej rozpowszechnione w przyrodzie niż flawiny, wykazują również aktywność biologiczną. Dlatego też stanowią one przedmiot zainteresowania licznych grup badawczych z różnych dyscyplin naukowych, w tym grupy badawczej pod kierunkiem prof. Marka Sikorskiego z Wydziału Chemii UAM, pod kierunkiem którego została wykonana przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska.

Porównanie właściwości spektroskopowych i fotofizycznych pochodnych 5-deazaalloksyny i 5-deazaalloksyny z analogicznymi izo- oraz alloksazynami, a także badania fotofizyczne monometylowych czteropierścieniowych pochodnych alloksazyny stanowią główny cel rozprawy, jaki postawił przed sobą Autor. Pobocznym, jednakże ważnym według Autora, celem rozprawy było znalezienie i przebadanie nowych wydajnych sensybilizatorów tlenu singletowego. Cele te postanowił zrealizować poprzez:

1. pomiary widm absorpcji, emisji, absorpcji przejściowej, wydajności kwantowych i czasów zaniku intensywności fluorescencji w rozpuszczalnikach o zróżnicowanym charakterze,

2. badanie równowag prototropowych pochodnych 5-deazaalloksazyny z zastosowaniem spektroskopii emisyjnej stacjonarnej (w tym synchronicznej spektroskopii fluorescencyjnej) i rozdzielonej w czasie, określenie zdolności do tworzenia wiązań wodorowych w stanie podstawowym i wzbudzonym,
3. badania fotoindukowanego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym dla 5-deazaalloksazyny oraz alloksazyn o budowie czteropierścieniowej,
4. określenie wydajności generowania tlenu singletowego w różnych rozpuszczalnikach z wykorzystaniem stacjonarnej i rozdzielonej w czasie fluorescencji w zakresie bliskiej podczerwieni,
5. optymalizacji geometrii stanu podstawowego i stanów wzbudzonych singletowych i trypletowych, energii przejść pomiędzy stanami, gęstości elektronowych i momentów dipolowych badanych związków, wykorzystując obliczenia metodami kwantowo-chemicznymi z wykorzystaniem metod *ab initio* oraz DFT.

Z lektury rozprawy wynika, iż Autor w pełni osiągnął wyznaczone sobie cele, a ich realizacja wymagała zastosowania różnorodnych technik badawczych.

Autor wykazał, iż 5-deazaalloksazyny posiadają bardzo zbliżone właściwości spektralne i fotofizyczne do alloksazyn i izoalloksazyn. Posiadają one w części długofalowej widma dwa dobrze rozdzielone pasma absorpcyjne, nieznacznie przesunięte w stronę krótkofalową w porównaniu do analogicznych alloksazyn. Charakter przejścia $S_0 \rightarrow S_1$ ma charakter typu $\pi\pi^*$, a widmo emisji składa się z jednego pasma. Pochodne 5-deazaalloksazyn, podobnie jak alloksazyny, obsadzają stany trypletowe, a czas zaniku absorpcji $T_1 \rightarrow T_n$ odpowiada typowej wartości rejestrowanej dla alloksazyn. Reakcja podwójnego przeniesienia protonu w stanie wzbudzonym w obecności kwasu octowego przebiega w sposób analogiczny jak dla alloksazyn. Badania efektów solwatochromowych wykazały, iż układ wiązań wodorowych tworzonych przez pochodne 5-deazaalloksyny jest analogiczny z układem wiązań wodorowych tworzonych przez analogiczne pochodne izo- i alloksazyn.

Istotniejsze różnice to większe wydajności kwantowe fluorescencji, jak i dłuższe czasy zaniku pochodnych 5-deazaalloksazyn w porównaniu do alloksazyn.

Dla pochodnych 5-deazaalloksazyn, w odróżnieniu od odpowiednich pochodnych alloksazyny, wykazano brak formy kationowej w silnie kwaśnych roztworach.

Pochodne 5-deazaalloksazyny są dobrymi sensybilizatorami tlenu singletowego, jednakże o nieco niższej wydajności za wyjątkiem 10-etylo-5-deazaizoalloksyny.

Ponadto Autor wykazał, iż ze względu na inną budowę, czteropierścieniowe alloksazyny wykazują znaczne przesunięcie widm absorpcji i emisji w stronę fal długich, wyższą wydajność kwantową fluorescencji, dłuższy czas zaniku intensywności fluorescencji, brak absorpcji tryplet-trypletowej oraz brak typowej tautomerizacji alloksazynowo-izoalloksazynowej w porównaniu do trójpierścieniowych alloksazyn.

Na podkreślenie zasługuje wykazanie przez Autora dużego potencjału stosunkowo mało popularnej techniki synchronicznej spektroskopii fluorescencyjnej w określaniu liczby fluoroforów obecnych w roztworze zarówno do celów analityki chemicznej, jak i w badaniach równowag zachodzących w roztworze.

Wyniki przedstawione w rozprawie stanowią bardzo wartościowy dorobek naukowy, pozytywnie już zrecenzowany przez społeczność naukową (większość wyników została już opublikowana) i stanowią istotny wkład do poznania właściwości spektralnych i fotofizycznych oraz oddziaływań międzycząsteczkowych 5-deazaalloksazyny i jej pochodnych oraz czteropierścieniowych pochodnych alloksazyny. Różnorodność stosowanych technik oraz skrupulatna analiza uzyskanych wyników świadczą o dużej wiedzy Autora i bardzo dobrym przygotowaniu do prowadzenia tego typu prac badawczych. Porównanie uzyskanych wyników z szeroką gamą pochodnych alloksazyny (obliczenia teoretyczne) wskazuje, iż dodatkowym celem rozprawy było usystematyzowanie rozproszonych informacji dotyczących podobieństw i różnic właściwości spektralnych i fotofizycznych alloksazyny, izoalloksazyny oraz 5-deazaalloksazyny i ich pochodnych.

Ocena formalna rozprawy.

Układ pracy, liczącej 315 stron i zawierającej 181 odnośników literaturowych, jest zgodny z układem przyjętym dla prac doktorskich z zakresu chemii. Składa się ona z siedmiu głównych rozdziałów oraz dodatkowych informacji obejmujących: streszczenie, spis publikacji własnych i wystąpień konferencyjnych, wykaz stosowanych skrótów oraz spis tabel (50) i rysunków (131).

Rozdział pierwszy zawiera krótki wstęp oraz cel ogólny i cele szczegółowe, jakie Autor rozprawy zamierza zrealizować. Rozdział drugi, czyli część literaturowa, obejmuje

63 strony. Autor opisuje w niej właściwości izo- i alloksazyn w stanach wzbudzonych singletowym i trypletowym, podwójne przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym, równowagi kwasowo-zasadowe oraz efekty solwatochromowe flawin. Ponadto zawarte są tam informacje na temat tlenu singletowego i jego właściwości oraz podstawowe informacje na temat synchronicznej spektroskopii fluorescencyjnej. Wstęp ten, mający na celu przygotowanie czytelnika do dalszej lektury rozprawy oraz uzasadnienie podjętych badań, napisany jest w sposób przejrzysty, ilustrowany jest czytelnymi schematami i wzorami.

Opis części eksperymentalnej liczy 19 stron i zawiera wykaz badanych związków obejmujący 5-deazaallosynę oraz 65 jej mono-, di- tri- oraz tertra-metylowych pochodnych, 10-etylo-5-deazaizoallosynę i dwie czteropierścieniowe pochodne allosyny oznaczone skrótem 1MeFR i 3MeFR. Dla wszystkich zostały wykonane obliczenia kwantowo-chemiczne, natomiast 9 pochodnych przebadano eksperymentalnie.

W tej części rozprawy znajduje się również wykaz stosowanej aparatury, metod pomiarowych oraz opis stosowanych metod obliczeniowych. Następnym rozdziałem jest rozdział zatytułowany "Omówienie wyników badań własnych", obejmujący 164 strony, który wraz z rozdziałem "Dyskusja końcowa i wnioski" (5 stron), stanowi najistotniejszą część rozprawy. Zawiera on wnikliwą analizę otrzymanych wyników oraz wartościowe uogólnienia poprzez uwypuklenie podobieństw i różnic w stosunku do analogów i pochodnych opisanych w literaturze. Recenzowaną rozprawę czyta się z zainteresowaniem. Wpływa na to nie tylko bardzo staranna szata graficzna, z czytelnymi rysunkami, ale przede wszystkim umiejętność opisu przez Autora w prosty, a zarazem ścisły sposób relacji zachodzących w badanych układach.

Praca napisana jest ładną polszczyzną, z czytelnymi i starannie wykonanymi ilustracjami. Korekta pracy jest staranna, niemniej można w niej znaleźć pewne uchybienia i nieścisłości. Ze względu na to, iż nie mają one wpływu na ocenę wartości naukowej rozprawy nie będę ich wszystkich wymieniał. Z obowiązku recenzenta przytoczę tylko niektóre z nich.

Strona 61, wiersz 14 od góry, niezrozumiałe jest zdanie zawierające frazę „...relaksacji stanu wzbudzonego przez energię potencjalną związaną z frakcją cząsteczek ...”

strona 65, wiersz 10 od góry, niefortunne sformułowanie „znaleziono obecność”.

strona 70, wiersz 5 od góry, pozostałość po korekcji „odgrywa jest mniej istotna” oraz wiersz 16 „czerwo-przesunięta”

strona 99, wiersz 8 od dołu, poprawniej byłoby napisać „drugorzędowe podejście rachunku zaburzeń”

strona 106, wiersz 12 od góry, Autor pisze „pojedyncze pasmo o Gaussianowskim kształcie” a z przedstawionych rysunkach na sąsiedniej stronie wynika, iż kształt pasma emisji ma raczej rozkład logarytmiczno-normalny.

Mam również parę uwag o charakterze dyskusyjnym.

W obliczeniach geometrii i energii stanów trypletowych brak jest informacji o kontaminacji funkcji opisującej ten stan.

Czy rdzeń alloksazyny można uznać za aromatyczny?

Czy tylko zerowa lub bardzo mała wartość siły oscylatora świadczy o przejściu typu $n \rightarrow \pi^*$?

Czy tylko dłuższy czas zaniku absorpcji przejściowej świadczy o obecności anionorodników? Przedstawione na rys. 48 widma absorpcji przejściowej zarejestrowane po czasie kilku i kilkudziesięciu mikrosekund są bardzo podobne.

Rysunek 52 A i B. Dla 8Me-5-DAll w widmie absorpcji przejściowej wg Autora występują pasma przy 450, 470 i 530 nm, natomiast dla 9Me-5DAll brak jest przejścia długofalowego pasma, chociaż na widmie widać wyraźną (dużo wyraźniejszą niż dla pochodnej 8Me-5-DAll) absorpcję w zakresie 500-600 nm.

Wydajność sensybilizacji tlenu singletowego była określana z zastosowaniem fluorescencji stacjonarnej i rozdzielonej w czasie. Czy użycie pola powierzchni pod krzywą zaniku fluorescencji nie byłaby lepszą (dokładniejszą) miarą wydajności sensybilizacji niż wartość amplitudy dla czasu $t=0$?

Ze względu na różne odchylenia standardowe deskryptorów i zmiennych zależnych, wartości współczynników regresji wieloparametrycznej nie dają bezpośredniej informacji o sile wpływu danego parametru na analizowaną wielkość fizykochemiczną. Określenie

standaryzowanych współczynników regresji pozwoliłoby na procentowe określenie ich udziału, co pozwoliłoby na głębszą dyskusję efektów solwatochromowych.

Nie podoba mi się określenie „totalna fluorescencja”. Sądzę, iż bezpośrednio tłumaczenie z języka angielskiego „excitation–emission matrix” jako macierz wzbudzeniowo-emisyjna jest bardziej zrozumiałe i lepiej oddaje istotę pomiarów.

Przedstawione uchybienia i uwagi o charakterze dyskusyjnym w niczym nie umniejszają wartości naukowej pracy.

Doktorant ma wszelkie cechy dobrego badacza. Zrealizowanie celów pracy wymagało od Niego wszechstronnych umiejętności. Mgr Gierszewski wykazał się dobrą znajomością wielu metod eksperymentalnych i chemii obliczeniowej. Dla przeprowadzenia wnikliwej i krytycznej analizy otrzymanych wyników niezbędna była wiedza z różnych dziedzin z pogranicza fizyki i chemii. W każdym z tych obszarów badawczych Autor rozprawy potwierdził swoje kompetencje. Umiejętność posługiwania się różnorodnymi, nowoczesnymi technikami badawczymi oraz umiejętność całościowego spojrzenia na badany problem, znamionuje osobę kompetentną w poszukiwaniu prawdy naukowej i dobrze przygotowaną do dalszej pracy badawczej.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgra Mateusza Gierszewskiego spełnia ustawowe (ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2014 poz. 1383)) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

