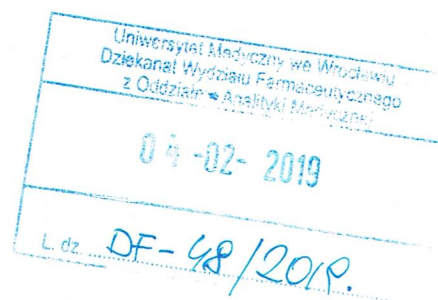


Dr hab. inż. Rafał Kruszyński
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
Żeromskiego 116
90-924 Łódź

Łódź, 24 stycznia 2019 r.

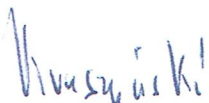


Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Pani mgr Eweliny Guszpit

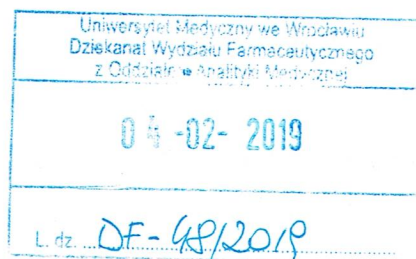
Rozprawa doktorska zatytułowana „Właściwości antyoksydacyjne metalotioneiny i jej zdolność do tworzenia kompleksów z kadmowo-tellurowymi kropkami kwantowymi” dotyczy jakże ważnych, a przy tym jeszcze w zauważalnej mierze nieopracowanych zagadnień projektowania i wytwarzania markerów umożliwiających selektywne oznaczanie białek w próbkach biologicznych, które to zagadnienia wpisują się we współczesne światowe trendy badawcze. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania zaprojektowania układów do oznaczania ludzkiej metalotioneiny, której to rutynowe oznaczanie jest problematyczne, między innymi ze względu na problemy z selektywnością i czułością znanych metod analitycznych. Cel ten został przez Panią mgr Ewelinę Guszpit w całości zrealizowany a osiągnięte rezultaty są istotne zarówno z czysto badawczego jak i z aplikacyjnego punktu widzenia. Istotnym elementem nowości naukowej zrealizowanych badań jest wykazanie możliwości rozróżnienia za pomocą proponowanego podejścia liczby cząsteczek ludzkiej metalotioneiny w supracząsteczce. Ponadto zastosowana metodyka może być również wykorzystana do oznaczania ilości ludzkiej metalotioneiny związanej z jonami kadmu, co również stanowi ważny element nowości naukowej i jest oryginalnym rozwiązaniem istotnego problemu analitycznego. Ze względu na wspomniane powyżej i szczegółowo opisane w recenzji istotne znaczenie osiągniętych przez Doktorantkę rezultatów badawczych, oryginalność i możliwość zastosowania zaproponowanej metodyki oznaczania ludzkiej metalotioneiny wnoszę o rozpatrzenie wyróżnienia opiniowanej rozprawy doktorskiej. Wyniki prac zostały upublicznione w postaci trzech artykułów naukowych w renomowanych czasopismach z Journal Citation Reports (tzw. Listy Filadelfijskiej) i znajdujących się na części A Wykazu czasopism naukowych MNiSW: *Journal of Nanoparticle Research* **17(11)**,

(2015) art. 423 (IF₂₀₁₅ = 2.101, Pkt.MNiSW₂₀₁₅ = 30), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **160**, (2017) str. 381-389 (IF₂₀₁₇ = 3.997, Pkt.MNiSW₂₀₁₆ = 35), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **170**, (2018) str. 447-453 (IF₂₀₁₇ = 3.997, Pkt.MNiSW₂₀₁₆ = 35) co spełnia wymogi formalne dotyczące opublikowania treści rozprawy doktorskiej rekomendowanej do wyróżnienia przez Radę Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich.


Rafał Kruszyński

Dr hab. inż. Rafał Kruszyński
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka
Żeromskiego 116
90-924 Łódź

Łódź, 24 stycznia 2019 r.



Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Eweliny Guszpit

Rozprawa doktorska zatytułowana „Właściwości antyoksydacyjne metalotioneiny i jej zdolność do tworzenia kompleksów z kadmowo-tellurowymi kropkami kwantowymi” dotyczy jakże ważnych, a przy tym jeszcze w zauważalnej mierze nieopracowanych zagadnień projektowania i wytwarzania markerów umożliwiających selektywne oznaczanie białek w próbkach biologicznych. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania zaprojektowania układów do oznaczania ludzkiej metalotioneiny, której to rutynowe oznaczanie jest problematyczne, między innymi ze względu na problemy z selektywnością i czułością metod analitycznych opisanych w literaturze przedmiotu. Już na wstępie należy podkreślić, że cel ten został przez Panią mgr Ewelinę Guszpit osiągnięty, i samo to spełnia wymogi artykułu 13, ustępu 1, ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”, z późniejszymi zmianami, utrzymane artykułem 179, ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, z późniejszymi zmianami.

Rozprawę stanowi tematycznie jednorodny cykl trzech publikacji z dołączonymi wymaganymi przepisami prawa oświadczeniami współautorów o ich udziale w poszczególnych pracach. Z przedstawionych oświadczeń jednoznacznie wynika wkład twórczy doktorantki i może być on uznany za wiodący we wszystkich trzech przypadkach. Autorka dołączyła do rozprawy doktorskiej obszerny przewodnik który ma strukturę tradycyjnej rozprawy doktorskiej.

We wstępach poszczególnych prac cyklu Autorka zwięźle, a przy tym wystarczająco, przedstawia istniejący stan wiedzy stanowiący podbudowę poszczególnych zagadnień badawczych oraz jednoznacznie precyzuje cele naukowe. Ujednolicone zestawienie tych informacji znajduje się w pierwszej części przewodnika, zatytułowanej jako „Wstęp” a odpowiadającej de facto części literaturowej tradycyjnej rozprawy doktorskiej. Nadmienić

należy że omawiana część rozprawy i przewodnika nie jest wyłącznie zbiorem danych literaturowych obrazujących istniejący stan wiedzy dziedziny, do której należą prowadzone przez Doktorantkę badania, ale zawiera ponadto krytyczne omówienie i wielowarstwową dyskusję wcześniejszych osiągnięć w analityce metalotionein oraz w chemii i zastosowaniu kropek kwantowych. Po zwięzłym przedstawieniu podstawowych informacji dotyczących struktury i właściwości metalotionein Autorka przedstawia problemy związane z ich analityką oraz przyczyny z których one wynikają. Omawiając preparatykę kropek kwantowych Doktorantka skupia się nie tylko na aspektach stricte syntetycznych, ale również przedstawia możliwości sterowania składem, rozmiarem i postacią ostateczną kropek kwantowych za pomocą czynników chemicznych i fizycznych. Opisując właściwości kropek kwantowych Autorka powiązuje je z ich aspektami strukturalnymi i topologicznymi, jak również odnosi się do wpływu tychże aspektów na strukturę elektronową kropek kwantowych. Opis ten właściwie uwypukla wpływ poszczególnych czynników na obserwowane właściwości luminescencyjne, będące podstawą dalszych badań. W dalszych częściach prac Autorka skupia się na przedstawieniu i dyskusji połączeń tworzonych pomiędzy kropkami kwantowymi a biocząsteczkami, w tym białkami i te fragmenty stanowią podbudowę do dyskusji wyników badań własnych Doktorantki. Omawiając kropki kwantowe Autorka podkreśla poprawnie potencjalne problemy z toksycznością niektórych rodzajów kropek kwantowych w przypadku używania ich w diagnostyce *in vivo*, choć należy zauważyć że przestawiona metodyka jest adekwatna do prowadzenia oznaczeń *ex vivo*, co powoduje że nawet w przypadku toksyczności kropek kwantowych nie ma to negatywnego wpływu na potencjalne zastosowanie opracowanej metodyki w diagnostyce klinicznej. We wstępach do poszczególnych prac Doktorantka przedstawia również własne podejście do problemu projektowania kropek kwantowych które mogą być zastosowane do oznaczania ludzkiej metalotioneiny, odnosząc się stosownie do obecnych w literaturze przedmiotu prac opisujących połączenia różnych metalotionein z kropkami kwantowymi.

Opierając się na wyżej wspomnianym podejściu Autorka zaprojektowała i zsyntezowała grupę związków zawierających połączenia metalotioneiny z strukturalnie różnymi kadmowo-tellurowymi kropkami kwantowymi. Dobierając kropki kwantowe uwzględniła nie tylko ich podstawowe właściwości, ale również wykorzystwała możliwość sterowania czynnikami elektronowymi i sterycznymi odpowiedzialnymi za wytworzenie połączeń z białkiem za pomocą odpowiedniego dostosowania rozmiaru kropek kwantowych. Takie podejście umożliwiło otrzymanie całej gamy związków charakteryzujących się różnymi właściwościami i konsekwentnie różnymi widmami luminescencji (zarówno w zakresie

energii jak i ilości fotonów emitowanych). Istotnym elementem nowości naukowej w tym wątku badawczym jest wykazanie możliwości rozróżnienia za pomocą proponowanego podejścia liczby cząsteczek ludzkiej metalotioneiny w supracząsteczce. Ponadto zastosowana metodyka może być również wykorzystana do oznaczania ilości ludzkiej metalotioneiny związanej z jonami kadmu, co również stanowi ważny element nowości naukowej. W dalszej części prac Autorka zbadała trwałości wykazujących fluorescencję form syntezowanych połączeń. Na podstawie oznaczeń ustaliła że formy te są trwałe w konkretnych przedziałach czasu, oraz że ich trwałość zależy od rozmiaru kropek kwantowych. Do oszacowania zależności zmian fluorescencji od czasu Doktorantka zaproponowała wykorzystanie zależności Sterna-Volmera opisującej wygaszanie stężeniowe fluorescencji. Jest to interesujące podejście przekształcające równanie opisujące warunki statyczne de facto w równanie opisujące warunki dynamiczne (trwałość kinetyczną formy wykazującej fluorescencję).

Jak już wspomniano na wstępie rozprawa stanowi tematycznie jednorodny cykl trzech publikacji. Poszczególne prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach rozpoznawalnych w dziedzinie (jedna w *Journal of Nanoparticle Research* a dwie w *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*) i samo to jest gwarancją merytorycznej poprawności. Poniższe uwagi nie są uwagami krytycznymi, należy je traktować wyłącznie jako pewne sugestie co do dalszego rozwoju tematyki badawczej. W wszystkich publikacjach stanowiących cykl Autorka obserwuje różny wpływ rozmiaru kropek kwantowych i czasu trwania układu metalotioneina – kropka kwantowa na intensywności i energii fluorescencji. Efekt ten tłumaczy głównie możliwością powstania i trwałością poszczególnych połączeń metalotioneina – kropka kwantowa. Założenie to jest merytorycznie uzasadnione, przy czym może nie do końca oddawać rzeczywiste zjawiska w badanych układach. W przypadku braku zauważalnych zmian fluorescencji (lub zmian niewielkich) może również wystąpić wytworzenie połączenia metalotioneina – kropka kwantowa z zachowaniem różnic energii pomiędzy orbitalami odpowiedzialnymi za fluorescencję (energia orbitali na skutek wytworzenia wiązań zmienia się zauważalnie ale różnica energii orbitali pozostaje niezmienną lub zmienia się w bardzo niewielkim stopniu). W takim przypadku trudno jest za pomocą zastosowanych metod eksperymentalnych jednoznacznie wykluczyć wytworzenie połączenia metalotioneina – kropka kwantowa. Należy w tym miejscu podkreślić że jednoznaczne określenie występowania oddziaływań wiążących metalotioneina – kropka kwantowa nie było celem rozprawy, tym samym brak takiego jednoznacznego określenia nie wpływa na ocenę merytoryczną. Widma fluorescencji poszczególnych układów

były wyznaczane dla jednej fali wzbudzenia, co powoduje że część informacji o zmianach energetycznych orbitali odpowiadających za fluorescencję mogła nie być zarejestrowana. Ze względu na charakter kropek kwantowych wytwarzane przez nie wiązania z cząsteczkami białek (koordynacyjne i supracząsteczkowe) mogą prowadzić do zmiany widma absorpcji związanego z fluorescencją (najczęściej poszerzenia maksimum absorpcji) i zachowania widma fluorescencji w maksimum energii wzbudzenia, przy jednoczesnej zmianie widma fluorescencji przy niższych wartościach absorpcji (zmiany te widoczne byłyby w trójwymiarowym widmie fluorescencji). Jakkolwiek efekt ten nie zawsze występuje, o tyle ciekawe byłoby zbadanie jego występowania dla studiowanych układów. Nasuwa się również pytanie czy zaproponowana metodyka umożliwi selektywne oznaczanie ludzkiej metalotioneiny przy obecności w próbce innych białek o zbliżonej budowie i czy zarejestrowanie widm dwuwymiarowych fluorescencji będzie wystarczające do rozstrzygnięcia tego problemu (można suponować że konieczne byłoby rejestrowanie widm trójwymiarowych). Badania trwałości wytworzonych połączeń zostały przeprowadzone w temperaturze otoczenia (*vide Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **160** (2017) str. 383), co w przypadku postulowanego zastosowania metodyki do oznaczeń *in vivo* może nie odzwierciedlać warunków rzeczywistych (analizy wykonano w temperaturze niższej niż w potencjalnych oznaczeniach *in vivo*, a wiadomym jest że kinetyka przemian układów biologicznych silnie zależy nawet od niewielkich zmian temperatury). Autorka obserwowane zmiany fluorescencji w czasie tłumaczy nietrwałością połączeń metalotioneina – kropka kwantowa, co jest pewnym skrótem myślowy ponieważ obserwowane zmiany świadczą o nietrwałości konkretnej struktury połączenia metalotioneina – kropka kwantowa wykazującej daną charakterystykę fluorescencyjną, a nie o nietrwałości połączenia metalotioneina – kropka kwantowa jako takiego (mogą występować zmiany strukturalne, np. zmiana konformacji metalotioneiny, zmiana liczby i charakteru wiązań metalotioneina – kropka kwantowa, zmiany struktury kropki kwantowej, wpływające na fluorescencję, a nie powodujące rozpadu połączenia metalotioneiny z kropką kwantową). Nie do końca ściśle jest też stosowany termin „wygaszanie” (ang. quenching) do oznaczenia obserwowanego zaniku fluorescencji w czasie. Termin ten oznacza zmniejszenie aktywności cząsteczki wzbudzonej poprzez czynniki zewnętrzne lub na skutek efektów podstawnikowych, a to nie zostało wykazane (postulowana zmiana oddziaływań nie spełnia wymogów definicji wygaszania fluorescencji).

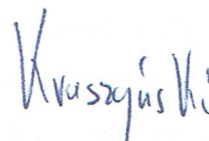
Przedstawiona praca jest spójna, napisana w sposób przejrzysty, zrozumiałym językiem fachowym, a poszczególne jej części są ze sobą właściwie powiązane (kolejne prace

cyklu wynikają z poprzednich). Oprócz dwóch drobnych niezręczności językowych wymienionych wyżej cykl publikacji nie zawiera istotnych niedoskonałości. Niestety nie udało się Autorce uniknąć pewnych nieścisłości językowych w dołączonym do rozprawy przewodniku. W większości przypadków stosowana terminologia jest poprawna, ale zdarzają się niewłaściwe słowa i sformułowania (będące w większości przypadków kalkami z języka angielskiego) lub niekonsekwencje, takie jak na przykład użycie sformułowań: „stabilnością kinetyczną” zamiast „trwałością kinetyczną” (np. na str. 8), „wysoką termodynamiką” zamiast „dużą nietrwałością termodynamiczną” (np. na str. 8), „antyoksydacyjnej” zamiast „przeciwiutleniającej” (np. na str. 13), „molekularnego” zamiast „cząsteczkowego” (np. na str. 14), „współczynnik molowy ekstynkcji” zamiast „molowy współczynnik absorpcji” (np. na str. 14), „efektu blaknięcia” zamiast „fotowybielania” (np. na str. 14, *nota bene* na stronie 15 znajduje się poprawnie użyte słowo „fotowybielania”), „interakcji” zamiast „oddziaływania” (np. na str. 25). W kilku miejscach przewodnika występują nieprecyzyjne stwierdzenia, np. na stronie 13 znajduje się stwierdzenie: „Pomimo braku właściwości redukujących, Zn zaliczany jest do elementów ochrony antyoksydacyjnej”, co nie jest stricte poprawne ponieważ cynk metaliczny ma właściwości redukujące (nie ma go jon cynku, i właściwym zapisem jest Zn^{2+} a nie Zn). Brakiem formalnym jest pominięcie podania temperatury otoczenia podczas oznaczenia trwałości wytworzonych połączeń (*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **160** (2017) str. 383), powoduje to że przedstawione rezultaty mogą być trudne do odtworzenia. Przytoczone powyżej nieścisłości językowe i formalne w żaden sposób nie umniejszają aspektów merytorycznych pracy, ani też poszczególnych osiągnięć Doktorantki.

Trudność zastosowanej metodyki polegała na konieczności skrupulatnego rozważenia wszystkich, bardzo złożonych, czynników wpływających na powstawanie wykazujących fluorescencję połączeń kropek kwantowych z ludzką metalotioneiną. Autorka zaprojektowała układy prowadzące do powstania związków wykazujących się charakterystyczną luminescencją, umożliwiające oznaczanie ludzkiej metalotioneiny. Wszystkie aspekty przeprowadzonych prac zostały przed Doktorantkę właściwie opisane i merytorycznie przedyskutowane. Zsyntezowane związki posiadały pożądaną strukturę (odpowiednie połączenia grup funkcyjnych białka z atomami metalu kropki kwantowej), dzięki czemu wykazały założone właściwości fluorescencyjne. Autorka merytorycznie postulowała przyczyny zmian fluorescencji zsyntezowanych połączeń występujące pod wpływem czasu. Na szczególną uwagę zasługuje fakt udowodnienia przez Doktorantkę możliwości rozróżnienia za pomocą opracowanej metodyki liczby cząsteczek ludzkiej metalotioneiny w supracząsteczce.

Podsumowując, Autorka właściwie zidentyfikowała problemy badawcze oraz przedstawiła spójny proces eksperymentów naukowych mających na celu ich wyjaśnienie, osiągając przy tym wszystkie zamierzone cele badawcze, a świadomy dobór kropek kwantowych umożliwił Jej opracowanie metodyki oznaczania ludzkiej metalotioneiny i jej wybranych form. Wyniki swoich prac opublikowała w wiodących czasopismach z dziedziny, do której należą prowadzone badania. Jak już zostało to podkreślone na wstępie, przedstawione w pracy i przytoczone powyżej osiągnięcia stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i z nawiązką wypełniają wymogi wyżej powołanej ustawy, oraz wymogi zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Ty samym, zgodnie z artykułem 13, ustępu 1, ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki”, z późniejszymi zmianami, utrzymanym artykułem 179, ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, z późniejszymi zmianami, rekomenduję Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Guszpit i dopuszczenie Jej do publicznej obrony.

Ponadto, ze względu na przytoczone powyżej istotne znaczenie osiągniętych przez Doktorantkę rezultatów badawczych, oryginalność i możliwość zastosowania zaproponowanej metodyki oznaczania ludzkiej metalotioneiny wnoszę również o rozpatrzenie wyróżnienia opiniowanej rozprawy doktorskiej. Wyniki prac zostały upublicznione w postaci trzech artykułów naukowych w renomowanych czasopismach z Journal Citation Reports (tzw. Listy Filadelfijskiej) i znajdujących się na części A Wykazu czasopism naukowych MNiSW: *Journal of Nanoparticle Research* **17(11)**, (2015) art. 423 (IF₂₀₁₅ = 2.101, Pkt.MNiSW₂₀₁₅ = 30), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **160**, (2017) str. 381-389 (IF₂₀₁₇ = 3.997, Pkt.MNiSW₂₀₁₆ = 35), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **170**, (2018) str. 447-453 (IF₂₀₁₇ = 3.997, Pkt.MNiSW₂₀₁₆ = 35) co spełnia wymogi formalne dotyczące opublikowania treści rozprawy doktorskiej rekomendowanej do wyróżnienia przez Radę Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich.



Rafał Kruszyński