

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. "Określenie metodami spektroskopowymi struktury biomateriałów
tworzonych na bazie protopofiryny IX"
autorstwa Pani mgr Moniki Walczak

Rozprawa doktorska pt. „Określenie metodami spektroskopowymi struktury biomateriałów tworzonych na bazie protopofiryny IX” wykonana została przez Panią mgr Monikę Walczak w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Jabłońskiej.

Metody spektroskopowe znajdują coraz częstsze zastosowania nie tylko w badaniach podstawowych ale coraz częściej w biologii i medycynie. Jak się okazuje, stosowana dyfrakcja rentgenowska do badania struktury najrozmaitszych związków nie zawsze pozwala jednoznacznie ją ustalić. Wraz z rozwojem akceleratorów i odkryciem promieniowania synchrotronowego nastąpił rozkwit innych metod badawczych, które stały się komplementarnymi i znacznie rozszerzyły zakres możliwości analitycznych. Dzięki zastosowaniu promieniowania synchrotronowego opracowano nowe techniki analityczne takich jak XANES/EXAFS (X-ray Absorption Near Edge Structure/Extended X-ray Absorption Fine Structure) pozwalające na specyficzne badanie składu fazowego – chemicznego materii. Badania te wydają się być obiecujące w zakresie poszukiwań nowych leków, czy badań etiologii wielu chorób. Wciąż nie są poznane procesy zachodzące w stanach patologicznych. Poznanie ich przyczyni się do lepszej profilaktyki, diagnostyki i w konsekwencji do leczenia. Podobnie, rozwijające się techniki diagnostyki medycznej wymagają coraz bardziej zaawansowanych badań w celu ich doskonalenia.

Pani mgr Monika Walczak postawiła sobie trudne zadanie dokonania analizy składu strukturalnego i lokalnego otoczenia atomów żelaza w związkach będących syntetycznymi odpowiednikami pigmentu malarii poddawanych działaniu organicznych rozpuszczalników, kwasu octowego, wody, roztworu dimetylosulfotlenku oraz chloro chininy – leku antymalarycznego. Ponadto, zadaniem autorki rozprawy było określenie miejsca wiązania atomu żelaza i bromu w strukturze diaminokwasowej pochodnej protoporfiryny IX związku będącego półproduktem fotouczulacza w diagnostyce i terapii nowotworów metodą fotodynamiczną. Poznanie tej struktury pozwoli na opracowanie metod usuwania tych pierwiastków w celu oczyszczania tych związków w procesie przygotowania fotuczulaczy dla PDD i PDT. W tym celu, Pani Walczak postanowiła zastosować techniki EXAFS i XANES. Wykonała nie tylko pomiary różnorodnych związków i w różnorodnych układach ale przeprowadziła dogłębną analizę otrzymanych wyników proponując pięć strategii analizy danych.

Recenzowana rozprawa zawiera się na 116 stronach, posiada wstęp, opis układów eksperymentalnych, charakterystykę i preparatykę próbek, opis podstaw teoretycznych analizy danych, szczegółową analizę danych, wyniki analizy danych eksperymentalnych, dyskusję wyników, bibliografię zawierającą 118 pozycji, jak

również spis publikacji i wystąpień konferencyjnych autorki. Tekst ilustrowany jest kolorowymi rysunkami, wykresami, tabelami oraz zdjęciami. Każdy rozdział podzielony jest na podrozdziały.

Po krótkim wstępie opisującym związki, w których występuje pierścień porfiryrowy oraz wyjaśnia jakie funkcje mogą one odgrywać w procesach chemicznych. Następnie autorka opisuje znaczenie badań związków tworzonych na podstawie protoporfiryny IX, wyjaśniając ogólny mechanizm działania chlorochininy jako leku antymalarycznego oraz wykazuje istotę działania związków stosowanych w diagnostyce i terapii fotodynamicznej. W ten sposób, Pani Walczak wprowadza czytelnika rozprawy do zagadnienia stanowiącego istotę rozprawy i pod koniec rozdziału pierwszego definiuje cele pracy.

Jak dowiadujemy się z późniejszych rozważań, malaria jest jedną z najczęściej spotykanych chorób zakaźnych na świecie w konsekwencji której, zgodnie z raportem Światowej Organizacji Zdrowia, mamy do czynienia z wieloma zgonami.

Zmiany patologiczne zachodzące w komórkach niejednokrotnie doprowadzają do stanów nowotworowych i rakowych. Dlatego też, medycyna stosuje najrozmaitsze metody diagnostyki i terapii w celu zapobieżenia, wyleczenia czy złagodzenia skutków chorób nowotworowych. Do metod tych zalicza się między innymi metodę fotodynamiczną opartą na wprowadzeniu do organizmu fotouczulaczy a następnie naświetleniu pacjenta w celu wywołania emisji promieniowania pozwalającego na wykrycie zmienionych patologicznie komórek i ich zniszczeniu.

Biorąc pod uwagę konieczność stałego doskonalenia metod diagnostycznych, profilaktyki i terapii słusznym wydają się postawione przez Panią mgr Monikę Walczak cele pracy do których należą:

- potwierdzenie podobieństwa struktury cząsteczek meso-hematyny do syntetycznie otrzymanej β -hematyny,
- zbadanie lokalnego otoczenia żelaza w syntetykach hemozoiny, β -hematyny, meso-hematyny w oddziaływaniach z chlorochiną mającego na celu wyjaśnienia mechanizmu działania chlorochininy na poziomie molekularnym, oraz
- znalezienie miejsca wiązania atomów żelaza i bromu w strukturze półproduktu fotouczulacza, co pozwoli na opracowanie metody oczyszczania aby związek ten nadawał się do zastosowań w PDD i PDT. Do realizacji postawionych celów autorka słuszenie postanowiła wykorzystać metody XANES i EXAFS oparte o zastosowanie promieniowania synchrotronowego.

Kolejny rozdział poświęcony jest części eksperymentalnej. Opisane w nim zostały wykorzystane do celów pracy stanowiska pomiarowe na synchrotronach w HASYLAB i ESRF, dokonano charakterystyki próbek i opisano proces ich przygotowania. Niezrozumiałym jest dlaczego autorka podaje angielskie nazwy związków chemicznych (str. 14 i wcześniej str. 2) jak np. iron(III) (protoporphrin-IX hydroxide) itd. skoro istnieją polskie nazwy tych związków zgodne z obowiązującym nazewnictwem chemicznym.

Rozdział 3 dotyczy teoretycznych podstaw analizy danych. Lektura tego rozdziału jednoznacznie wskazuje na dogłębne zrozumienie przez Panią Walczak

zagadnień fizycznych i aparatu matematycznego niezbędnego do właściwego opracowania danych. Dwie uwagi jakie nasuwają się podczas jego lektury to:

- należałoby zdefiniować granicę E_C pomiędzy obszarem XANES i EXAFS, albowiem samo zaznaczenie jej na rys. 3.2 nie jest jednoznaczne, podobnie jak nie wiadomo co oznaczają zaznaczone linie przerywane na tym rysunku,

- niezrozumiałym jest też, wręcz slangowym, określenie *wyrażenie na dipol elektryczny*.

Potwierdzeniem dogłębnej znajomości tematyki związanej z zastosowaniami spektroskopii XAFS jest rozdział 4, w którym autorka w przejrzysty i konsekwentny sposób przedstawia strategie przyjęte do analiz EXAFS. W sposób całkowicie przekonujący zwraca uwagę na trudności jakie można napotkać podczas interpretacji widm i podaje propozycje czynników jakie należy uwzględnić do poprawnej ich analizy, którymi są uwzględnienie wielokrotnych rozproszeń.

Najobszerniejszy rozdział przedstawionej do recenzji pracy stanowi rozdział 5, w którym przedstawiono wyniki i przeprowadzono dyskusję na bazie której dokonano podsumowania w rozdziale 6.

Zawarte w rozdziale 5 wyniki z analiz bardzo wielu pomiarów świadczą o czasochłonności i ogromie pracy eksperymentalnej jaki został włożony przez autorkę. Zastosowanie szeregu dopasowań, modeli, analiz, oraz obliczeń jak i wizualizacja wyników przekonują o dojrzałości eksperymentalnej Pani mgr Moniki Walczak.

Przedstawione wyniki analiz XANES i EXAFS potwierdziły słusność obranych strategii albowiem autorce udało się otrzymać bardzo dobre dopasowania przyjętych modeli dla poszczególnych stref koordynacyjnych. Ta część pracy wykonana jest bardzo starannie, konsekwentnie, systematycznie i z należytą analizą otrzymanych wyników. Jedynie czego mi zabrakło to opisu sposobu normalizacji widm XANES. W przypadku tej pracy widma zostały znormalizowane do maksimum w tzw. białym pikie. Byłoby dobrze gdyby w pracy znalazło się uzasadnienie takiego sposobu normalizacji.

Podsumowanie pracy zawiera wnioski w odniesieniu do zamieszczonych we wstępie rozprawy celów. Przeprowadzone badania dostarczyły oczekiwanych informacji na temat struktury związków opartych na bazie protoporfiryny IX.

Z obowiązku recenzenta muszę jeszcze zwrócić uwagę na drobne błędy edytorskie, które jednak nie umniejszają wartości rozprawy. I tak:

- str. 18 – niegramatyczna składnia językowa *1 cm średnicy i 1 mm grubości*, powinno być raczej o średnicu 1 cm i grubości 1 mm,
- str. 26 – określenie iż *rozwiniecie, które jest wyrażeniem na elektryczny dipol* jest typowym przykładem slangu naukowego,
- str. 30 – niegramatyczne zdanie *Pracy P.A. Lee oraz J.B. Pendry zawiera dokładny opis wyznaczenia macierzy Z [56]*,
- str. 67 – rysunek 5.12 po lewej stronie zawiera dwie krzywe dotyczące mesohematyny, nie zaznaczono która z nich jest pochodną a która widmem XANES,
- str. 68 – rysunek 5.13 – podobnie j.w. a w dodatku niezbyt szczęśliwie dobrano kolory lini co czyni je nierozróżnialnymi ,
- str. 69 – rysunek 5.14 – uwagi j.w.,
- str. 83 – rysunek 5.26 – uwagi j.w.,
- str. 87 – rysunek 5.32 – uwagi j.w.,

Podsumowując, stwierdzam, że wyniki z przeprowadzonych badań mogą mieć istotny wpływ na wzbogacenie naszej wiedzy z zakresu struktury i składu układów złożonych do jakich należą związki protoporfiryny IX. Z punktu widzenia fizyki, autorce udało się w przedstawionej rozprawie połączyć rozważania czysto-fizyczne z ich zastosowaniami do badań interdyscyplinarnych a w szczególności do badań biologicznych układów złożonych, uwypuklając fizyczne aspekty przeprowadzonych obliczeń i dopasowań, dając dowód pełnego zrozumienia omawianych zagadnień i zjawisk fizycznych. Dlatego też, biorąc pod uwagę ogrom pracy, jaki został włożony przez Panią mgr Monikę Walczak w przeprowadzenie eksperymentów, opracowanie otrzymanych wyników pomiarowych oraz ich interpretację **wnioskuje o dopuszczenie Pani mgr Moniki Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie stwierdzam, że niniejsza rozprawa **może być przedmiotem publicznej obrony i wnioskuje o jej wyróżnienie.**

Jr. dr. Stanisław