

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Moniki Sylwii Walczak
p.t. „Określenie metodami spektroskopowymi struktury biomateriałów
tworzonych na bazie protoporfiryny IX”

Praca doktorska mgr Moniki Sylwii Walczak „Określenie metodami spektroskopowymi struktury biomateriałów tworzonych na bazie protoporfiryny IX” została wykonana z zastosowaniem metod absorpcji promieni rentgenowskich, w Instytucie Fizyki PAN pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Ławniczak-Jabłońskiej i jest poświęcona badaniom otoczenia atomu Fe w organicznych związkach mających powiązanie z powstawaniem i terapią malarii oraz z terapią chorób nowotworowych. Badania wykonano metodami absorpcji rentgenowskiej z wykorzystaniem rentgenowskiej wiązki synchrotronowej. Zrozumienie struktury zbadanych związków i roztworów ma istotne znaczenie dla postępu w działach medycyny związanych z tymi chorobami.

Rozprawa liczy 111 stron i podzielona jest na sześć rozdziałów: 1. Wstęp, 2. Eksperyment, 3. Metody teoretyczne analizy danych, 4. Analiza danych, 5. Wyniki oraz dyskusja, 6 Podsumowanie. Wśród referencji znajdują się dwie publikacje autorstwa mgr Moniki Walczak (nr 76 i 114) ściśle związane z tematyką rozprawy i z których niektóre wyniki włączono do rozprawy. W publikacjach tych, zamieszczonych w cenionych czasopismach (*Nuclear Instruments and Methods B*, *Journal of Physics: Condensed Matter*) mgr Monika Walczak jest pierwsza na liście autorów. Praca uzupełniona jest o listę publikacji i prezentacji Autorki. Niektóre wyniki Autorki związane z tematyką rozprawy przedstawione zostały w trzech raportach ośrodków synchrotronowych oraz w ramach trzech prezentacji konferencyjnych ustnych i siedmiu posterowych.

Rozdział 1 (Wstęp, str. 1-10) poświęcony jest opisowi związków organicznych otrzymywanych na bazie protoporfiryny IX. Do związków na bazie protoporfiryny IX należą hemozoina - naturalny produkt pasożyta malarii - i jej syntetyczne odpowiedniki beta-hematyna i mezoematyna (podobieństwa i różnice w ich budowie w stosunku do hemozoiny są dyskutowane w literaturze, mimo że struktura samej hemozoiny nie została opublikowana) (str. 2), oraz liczne fotouczulacze.

Pierwsza część **Wstępu** zawiera ogólne informacje o protoporfirynie i materiałach pokrewnych. Zakres opisu jest wystarczający, jednak dla czytelników pragnących pogłębić wiedzę korzystne byłoby odesłanie ich do lektury takiej jak np. praca I.Żak na temat porfiryn¹. W szczególności, budowa protoporfiryny IX podana jest jedynie w sposób opisowy i poprzez schemat graficzny, a nie podano formuły ($C_{34}H_{34}N_4O_4$), co nieco utrudnia nieobeznanemu czytelnikowi powiązanie budowy tej cząsteczki z budową innych związków będących przedmiotem badań rozprawy. We **Wstępie** autorka omawia również pokrótce stan wiedzy na temat działania przeciwmalarycznego leku, jakim jest chlorochinina: pewne aspekty działania są z grubsza znane, jednak brak jest w literaturze pełnego wyjaśnienia na poziomie molekularnym. Wyjaśnienie tego mechanizmu jest bardzo istotne m.in. ze względu na pojawianie się szczepów pasożyta odpornych na chlorochininę, co powoduje konieczność opracowania nowych leków.

Dla hemozoiny (produktu naturalnego) brak jest pełnej wiedzy o strukturze. Autorka przytacza uzasadnione opinie o podobieństwie hemozoiny i jej syntetycznych odpowiedników, w szczególności o identyczności lub znacznym podobieństwie struktur hemozoiny i beta-hematyny. Prace na temat syntetycznych odpowiedników mogą stanowić krok na drodze do określenia budowy tak molekuly jak i komórki elementarnej tego związku. Autorka w pracy przyjmuje słuszne założenie (wyrażone na stronie 64), że beta hematyna jest odpowiednikiem hemozoiny.

¹ I. Żak, Porfiryny i pochodne, rozdz. 17, str. 301, w: I. Żak (wyd), "Chemia Medyczna", <http://biochigen.slam.katowice.pl/podrecznik.htm>

Prace na temat mezoheMATYNY są w literaturze niezbyt liczne, można znaleźć wzmianki m.in. o jej działaniu antybakteryjnym², co mogłoby być interesujące dla czytelnika, jednak Autorka o tym nie wspomina. W rozprawie określono mezoheMATYNĘ tylko jako "syntetyczny odpowiednik hemozoiny" (str. 8), a różnica w jej budowie w stosunku do hemozoiny jest przedstawiona w zgodzie z obecnym stanem wiedzy o tych strukturach, poprzez wizualizację molekuł (rysunki na str. 8 i 17). Zaletą mezoheMATYNY jest jej rozpuszczalność w słabych kwasach i niektórych rozpuszczalnikach, co ułatwia np. badanie oddziaływania z lekami antymalarycznymi - z tego powodu mezoheMATYNA jest przedmiotem zainteresowania Autorki. (Wspomniane oddziaływanie jest jednym z przedmiotów rozprawy.) Istotność badań roztworów wynika z potrzeby wykonania preparatu, który mógłby stanowić model środowiska zbliżonego do warunków fizjologicznych. Brak dokładniejszego opisu w rozprawie dla struktury mezoheMATYNY jest uzasadniony faktem, że struktura ta nie została jeszcze opublikowana przez Bohle'a. Zamieszczono w pracy tylko rysunek cząsteczki i schemat komórki elementarnej mezoheMATYNY (rys. 2.3 str. 17, rys 5.1 str. 52).

Na stronach 6,7 i 9 przedstawiono mechanizm działania fotouczulaczy, substancji, które często bazują na protoporfirynie IX. Dzięki selektywnemu wnikaniu w komórki nowotworowe, substancje te służą do niszczenia komórek nowotworowych.

Na zakończenie rozdziału 1 Autorka w skrócie określiła cel badań:

- potwierdzenie podobieństwa molekuł beta- i mezoheMATYNY,
- określenie zmiany lokalnego otoczenia jonu Fe w wyniku dodania chlorochininy do roztworu mezoheMATYNY,
- zlokalizowanie atomów Fe i Br w związku będącym diaminową pochodną protoporfiryny IX (związek ten jest półproduktem w procesie syntezy fotouczulaczy).

Rozdział 2: "Eksperyment" (strony od 11 do 20) jest poświęcony zwięzłemu omówieniu technik eksperymentalnych zastosowanych w rozprawie. Przedstawiono aspekty doświadczalne przeprowadzonych badań, w tym wykorzystane linie eksperymentalne przy synchrotronach w Hamburgu i Grenoble. Opisano próbki, sposób ich przygotowania, przedstawiono cząsteczki niektórych spośród badanych substancji i rozmiary ich komórek elementarnych.

Celem **rozdziału 3-go "Metody teoretyczne analizy danych"** (strony od 21 do 35) jest zapoznanie czytelnika z teoretycznymi metodami analizy danych absorpcyjnych metod EXAFS i XANES. Rozdział ten pełni pożyteczną funkcję wprowadzającą czytelnika w tematykę obliczeniową metod absorpcji. W prosty i logiczny sposób omówiono podstawy fizyczne metod ilustrując je graficznie. Następnie przedstawiono podstawy teorii, na której opiera się dokonana w pracy interpretacja pomiarów absorpcyjnych EXAFS i XANES, oraz przedstawiono pakiety programów, zastosowane w obliczeniach. Na uwagę zasługuje wykonanie części obliczeń (dla metody XANES) przy pomocy różnych pakietów równoległe, w celu konfrontacji wyników obliczeniowych. Sposób przedstawienia materiału teoretycznego w tym rozdziale zasługuje na uznanie.

W **rozdziale 4 "Analiza danych"** (strony od 36 do 48) Autorka prezentuje i szeroko omawia przyjęte w pracy strategie obliczeniowe. Specjalne strategie były w tym przypadku konieczne ze względu na złożoność analizowanych struktur. W **rozdziale 5 "Wyniki oraz dyskusja"** (strony od 49 do 101) Autorka szczegółowo przedstawia i analizuje wyniki swoich badań. Jest to logicznie i przejrzysto zorganizowana zasadnicza część rozprawy.. Przedmiotem prac

² Ivanovics G , Koczka S, Relationship between antibacterial effect of mesohematin and bacterial cell structure., Acta Physiologica Hungarica [1952 (3) 441-457

były wspomniane wyżej materiały polikrystaliczne, wykazujące pokrewieństwo strukturalne z protoporfiryną IX, a także roztwory jednego z nich (mezoematyny) o równie skomplikowanej budowie. Uzasadnieniu wyboru każdej strategii towarzyszy ilustracja uzasadniająca ten wybór. Rozdział ten jest podzielony na podrozdziały. Podrozdział 5.1 dotyczy substytutu pigmentu malarii jako związku krystalicznego, podrozdział 5.2 - jak wyżej lecz w roztworze przed i po reakcji z chlorochinina, a podrozdział 5.3 omawia otoczenie pierwiastków ciężkich w cząsteczce fotouczulaczy.

▪ **Analiza danych EXAFS:**

Naturalną jest rzeczą, że wyniki badań EXAFS, gdzie analizuje się otoczenie lokalne, są porównywane z danymi krystalograficznymi, jeśli takie dane istnieją. W ramach rozprawy, autorka wyliczyła takie dane dotyczące odległości atomów kolejnych stref od atomu Fe dla beta hematyny i mezoematyny (Tabela 5.1). Daje to możliwość dokonania wspomnianych porównań dla tych dwóch materiałów. Porównanie wyników badań z tą tabelą pokazuje, iż analiza widm EXAFS daje wiarygodne rezultaty dla materiałów tego typu. W szczególności Autorka wykorzystuje to porównanie w analizie odległości sąsiadów od atomu Fe na str. 56/57 i na str. 60. Wiarygodność ma szczególne znaczenie przy prowadzonej w rozprawie dyskusji wyników dla próbek niekrystalicznych, dla których nie ma możliwości wykonania takiego porównania.

Wyniki dopasowań EXAFS przedstawione w dalszych tabelach rozdziału 5-go (str. 53-65), są w dobrej zgodności z danymi krystalograficznymi. Obliczenia dla materiałów polikrystalicznych prowadzone były różnymi strategiami i wyniki dla każdej z nich są umieszczone w pracy. Wyniki działania tych strategii nie są znacząco różne, jednak autorka powinna była przedstawić jako jedną z konkluzji określenie, która strategia i dlaczego powinna być preferowana.

Jedyną pracą w omawianej dziedzinie, wykorzystującą metody absorpcji, jest praca Slatera i innych (ref. 35) podająca m.in. odległości stref od jonu Fe dla hemozoiny a także dla heminy wyznaczone metodą EXAFS. Rozprawa byłaby naturalnym miejscem, na pokazanie zgodności wyników Autorki z wynikami Slatera, w której metodą EXAFS otrzymano następujące parametry dla hemozoiny: wg tabeli 5.8 pierwsza strefa ośmiu atomów węgla 3.006-3.069 Å (Slater 3.000 Å i 3.110 Å średnio dla każdej z dwóch podstref czteroatomowych w hemozoinie), druga strefa czterech atomów węgla 3.425-3.453 Å (Slater 3.395 Å). O wynikach Slatera warto było w rozprawie przynajmniej wspomnieć.

▪ **Analiza danych XANES:**

Analiza metadą XANES stanowi wartościowe uzupełnienie wyników otrzymanych dla mezoematyny metodą EXAFS, pozwalając na potwierdzenie dimerowej struktury cząsteczki mezoematyny.

Praca uzupełniona jest o **listę publikacji i prezentacji autorki**. Jednak ta umieszczona na końcu rozprawy lista nie uwzględnia wszystkich dokonań Autorki:

- Pracy nr 23 (prezentacja posterowa) towarzyszył obszerny abstrakt rozszerzony w Synchrotron Radiation in Natural Science 5, No 3 (2006) (Struktura lokalna wokół atomów Mn implantowanych w krzemie, A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M.S. Walczak, A. Misiuk).
- Brak na liście raportów: (1) Estimation of Fe – phases content in Norwegian ilmenite using XANES spectra, M. Klepka, K. Lawniczak-Jablonska, M.S. Walczak, M. Jablonski (2005), (2) XANES study of Mn based phases in ilmenites, M.T. Klepka, A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, M. Jablonski (HasyLab 2007).
- Współautorstwo ogłoszonego w 2007 przez A. Sienkiewicza roku referatu: A. Sienkiewicz, B. Vileno, J. Krzystek, K. Pierzchała, M. Lekka, M.S. Walczak, K. Ławniczak-Jabłońska, L. Forró, D.S. Bohle, Oxidative

Stress on Biological Targets – from Man-Made Nanoparticles to Malarial Pigments – an ESR Study, III Symposium on: Nuclear Magnetic Resonance in Chemistry, Biology and Medicine, Warszawa, 20–22.09.2007.

- Pierwsza praca na liście publikacji wykazana jako przesłana do recenzji została już wydana w Rev. Sci. Instrum. 79, 103302 (2008).

Warto dodać, że jeden z posterów (EMRS 2007) został wyróżniony przez organizatorów EMRS Fall Meeting, odbywającej się w Warszawie dużej konferencji o randze europejskiej.

Uwagi krytyczne

Moim zdaniem należało podać formuły chemiczne wszystkich związków, dla których są one znane (nie podano formuły np. dla protoporfiryny IX).

Przy grupie symetrii na str. 15 użyto tajemniczego skrótu "notacja H-M". Notacja Hermanna-Manguina praktycznie wyparła inne, więc nie było potrzeby umieszczania tej informacji.

Umieszczenie informacji o budowie cząsteczek niektórych badanych materiałów w opisie eksperymentu (Rozdział "Eksperyment") nie jest najszcześniejszym rozwiązaniem (struktury innych są opisane w innych miejscach rozprawy) - wydaje się, że lepsze byłoby stworzenie osobnego rozdziału, lub podrozdziału w innym rozdziale, gdzie przedstawiono by dotychczasową wiedzę o strukturze badanych materiałów.

W swoim artykule z roku 2005 Autorka wspomniała o pracach Boffiego i Patela, które stosowały metody absorpcji rentgenowskiej do innych materiałów opartych na protoporfirynie. Uwzględnienie wspomnianych prac w dyskusji w ramach rozprawy mogłoby być pożyteczne, gdyż umieściłoby wynik rozprawy w szerszym kontekście..

W analizie odległości sąsiadów od atomu Fe na str. 56/57 i na str. 60 powinien być odnośnik do Tabeli 5.1. Wydaje się, że dane z tej tabeli mogłyby być jeszcze szerzej wykorzystane przy dyskusji otrzymanych wyników.

Przykłady uchybień językowych:

- dla mezoematyny Autorka używa nie przyjętej w języku polskim nazwy "meso-hematyna".
- częsta zamiana w tekście czcionek polskich na angielskie
- odmiana zwykle "Debya" (czasem inaczej, "Deby'a" na str 29) zamiast "Debye'a",
- "warjancja" zamiast "wariancja" (str 29),
- "ekspotencjalny" zamiast "eksponencjalny" (str 29),
- "hemozoina - naturalny produkt malarii" (lepiej: "hemozoina - naturalny produkt pasożyta malarii")

Warto zauważyć, że rozprawa pisana jest ładnym językiem. Co prawda można spotkać w tekście dość liczne drobne niedociągnięcia (przykłady podano powyżej), użyte składnia i styl poza takimi nieistotnymi wyjątkami, wynikającymi zapewne z pośpiechu przy redagowaniu wersji ostatecznej, mogą być wzorem dla innych.


Podsumowanie recenzji

Będące przedmiotem pracy materiały zostały przez mgr. Monikę Walczak scharakteryzowane metodami EXAFS i XANES po raz pierwszy. Jak dotąd w literaturze był znany tylko wynik pomiarów absorpcji Slatera i współpracowników (metoda EXAFS) dla beta hemozoiny, podczas gdy głównym celem rozprawy jest mezochematyna i jej wiązki. Rozprawa ma charakter pionierski, gdyż większość dokonań jest całkowicie nowa, a wyniki dla beta hemozoiny nie są prostym powtórzeniem pracy Slatera, lecz idą znacznie dalej. Materiał zawarty w rozprawie jest bardzo obszerny i z pewnością może być podstawą dalszych publikacji w międzynarodowych czasopiśmie.

Autorka wykonała kompleksowy program badawczy, obejmujący analizę struktury szeregu substancji bazujących na cząsteczce protoporfiryny IX. Zadania pomiarowe zostały wykonane na liniach synchrotronowych w Hamburgu i Grenoble. Pomiary synchrotronowe charakteryzują się tym, że dostęp do wiązki promieniowania jest ograniczony do kilku czy kilkunastu dni. Tak więc aby osiągnąć sukces pomiarowy, należy dobrze przygotować daną sesję pomiarową, bo możliwości korekty czy uzupełnienia praktycznie nie istnieją. Po drugie, proces pomiarowy jest bardzo "intensywny" w wyniku narzuconego zobowiązania pełnego wykorzystania wiązki w trybie całodobowym. Program badań został przez mgr Monikę Walczak wykonany wzorowo i cele pomiarowo-obliczeniowe, postawione na początku rozprawy, zostały osiągnięte z nawiązką. Sukcesem doktorantki jest m.in. pokazanie, że techniki EXAFS i XANES mogą być zastosowane do określania struktury lokalnej roztworów substancji bazujących na cząsteczce protoporfiryny IX. Badania wykonane w ramach recenzowanej pracy dały wiele wartościowych rezultatów. Niezależnie od drobnych uchybień mgr Monika Walczak właściwie zrealizowała szeroki program badawczy, umiejętnie planując i prowadząc eksperymenty na liniach synchrotronowych i prowadząc żmudne obliczenia związane z interpretacją danych eksperymentalnych. Wyniki uzyskane przez doktorantkę na temat struktury lokalnej roztworów mezochematyny przed i po reakcji z chlorochiną oraz struktury dialaninowej pochodnej protoporfiryny IX mogą mieć istotne znaczenie dla doskonalenia metod terapii malarii i chorób nowotworowych.

Na uznanie zasługuje zgromadzona bibliografia. Wyszukanie tak licznych pozycji związanych z tematem wydaje się być szczególnie trudne z powodu konieczności systematycznego przeszukiwania trudno dostępnych w Instytucie Fizyki baz danych obejmujących medycynę i biologię.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny. Autorka przedstawiła szeroki materiał, w którym wykorzystwała dane eksperymentalne i wyniki własnych obliczeń, wnikliwie przeanalizowany w oparciu o dostępną wiedzę literaturową. Uwagi krytyczne wyrażone w niniejszej recenzji nie wpływają na moją wysoką ocenę rezultatów przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr. Moniki Walczak. Rozprawa napisana jest poprawnym i zrozumiałym językiem, a liczba błędów językowych jest niewielka. Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa Moniki Sylwii Walczak spełnia bez zastrzeżeń warunki stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, oraz wnioskuję o wyróżnienie tej rozprawy.



Wojciech Paszkowicz