

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Kozińskiej, pt.
"Fotoreaktywność i efektywność fotodynamiczna nowej generacji
fotosensybilizatorów w układach modelowych i komórkowych"**

Rozprawa doktorska pt. "Fotoreaktywność i efektywność fotodynamiczna nowej generacji fotosensybilizatorów w układach modelowych i komórkowych" została przygotowana przez mgr Annę Kozińską pod kierunkiem Profesorów Wojciecha Gawlika z Zakładu Fotoniki Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej i Tadeusza Sarny z Zakładu Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Celem pracy jest zbadanie w układach modelowych *in vitro* mechanizmów oraz ogólnej efektywności reakcji fotodynamicznych z udziałem fotouczulaczy nowszej generacji należących do dwóch grup związków: funkcjonalizowanych pochodnych fulerenu i modyfikowanych powierzchniowo tlenków tytanu. Taka charakterystyka akcji fotodynamicznej z udziałem wspomnianych fotouczulaczy jest istotna z punktu widzenia możliwości zastosowań klinicznych nowej generacji fotouczulaczy. Dla zrealizowania ogólnego celu pracy, doktorantka prawidłowo sformułowała kilka celów szczegółowych. W szczególności podjęła się: (1) wyznaczenia wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego przez wybrane fulereny i modyfikowane ditlenki tytanu; (2) zbadania uczulanego fotoutleniania wybranych substratów biologicznych, oraz (3) charakteryzacji wolnych rodników generowanych przez fotowzbudzone fulereny i ditlenki tytanu. Rozprawa przedstawiona na 183 stronach w części zasadniczej oraz 8 stronach dodatku, ma klasyczny układ. Rozpoczyna ją wstęp, będący obszernym przeglądem literatury związanej z przedmiotem badań. Przedstawia on w sposób wyczerpujący aktualny stan wiedzy o zagadnieniach będących przedmiotem rozprawy. Uwagi recenzenta nie zmieniają ogólnego dobrego wrażenia wyniesionego z lektury tego rozdziału. I tak:

Pewne zastrzeżenia budzi używanie anglicyzmów w rodzaju "fotosensybilizator", "fotosensybilizacja" itp. podczas gdy istnieją powszechnie używane polskie odpowiedniki: fotouczulacz, fotouczulanie itp.

Str. 14, w. 7 od g.: W zależnej od ALA terapii fotodynamicznej aktywny fotouczulacz PpIX istotnie syntetyzowany jest w mitochondriach. Ma on jednak zdolność dyfuzji do inch obszarów komórkowych. Zatem wybiórcze uszkodzenie mitochondriów silnie

zależać będzie od okna czasowego wybranego dla naświetlania od momentu wprowadzenia ALA. Dla dłuższych czasów inkubacji PpIX wykrywa się nie tylko w mitochondriach ale i w innych obszarach komórki.

Str. 27, w. 11 od g.: Kiedy rozważamy peroksydację lipidów błonowych, termin "nadtlenki kwasów tłuszczowych" jest niepoprawny jako, że a) w błonie komórkowej takowe nie występują i b) kwasy tłuszczowe formalnie nie należą do grupy związków określanych mianem lipidów.

Na kolejnych trzech stronach autorka rozprawy szczegółowo formułuje cele stawiane sobie w opisanych dalej badaniach. Ich sformułowanie nie budzi zastrzeżeń poza błędnym określeniem (str. 46 w.6 od d.) "fotosensybilizowanego utleniania", które w istocie dotyczy "uczulanego fotoutleniania".

Kolejny rozdział "Materiał i Metody" nie budzi większych zastrzeżeń poza drobnymi nieścisłościami:

Str. 59, w. 11 od d.: niezrównoważone równanie reakcji

Str. 60, w. 1 od g.: sformułowanie "czystego eppendorfa" jest kolokwializmem, który w istocie powinien brzmieć "czystej probówki eppendorfa"

Str. 61 w. 11 od g.: Uzyskanego w ten sposób materiału nie można nazwać "rozpuszczonymi komórkami" a jedynie w najlepszym przypadku "solubilizowanym materiałem komórkowym".

W kolejnym, obszernym rozdziale (70 stron) autorka przedstawia w wyczerpujący sposób wyniki i częściową analizę przeprowadzonych eksperymentów. Generalnie biorąc doświadczenia przeprowadzono prawidłowo, zwracając szczególną uwagę na prawidłowy i wyczerpujący dobór eksperymentów kontrolnych. Recenzent ma jednak kilka uwag szczegółowych:

1. Na rys. 22D wyraźnie przedstawiono zależność intensywności sygnału adduktu spinowego od dawki światła, w części A i B tegoż rysunku nie zaznaczono jednak dla jakiej dawki światła uzyskano przedstawione tam sygnały

2. Dlaczego nie zaobserwowano adduktu DMPO-OH skoro postuluje Pani wtórną reakcję redukcji H_2O_2 z wytworzeniem rodnika hydroksylowego (na co zdają się wskazywać wyniki z salicylanem)
3. Drobną niescisłość w opisie rysunku 31 – zamiast “2 mM His oraz 2 mM NADH” powinno być “2mM HIS lub 2 mM NADPH” jako, że związki te stosowano rozdzielnie
4. Rys. 48 i 50: szybkość akumulacji LOOH (~ 0.35 uM/sec) znacząco przewyższa szybkość zaniku tlenu (~ 20 uM/sec). W rzeczywistości nie jest to możliwe.
5. Str. 103 w. 8 od d.: nie sprecyzowano ile wprowadzano kwasu linolenowego. Nie ma tej wiadomości również w rozdziale Materiały i Metody.
6. Rys.51-53, str. 105-108: przedstawione wyniki byłyby bardziej przekonujące gdyby użyto katalitycznych stężeń FeHQ. Użyte stężenie (25 uM) jest stechiometryczne w stosunku do wygenerowanych wodoronadtlenków cholesterolu (Fig. 52B). Ponadto w analizie wyników całkowicie pominięto napędzaną wodoronadtlenkami fosfolipidów wolnorodnikową, wtórną peroksydację cholesterolu. Pominięto również istotną dla wyższych stężeń 5a-OOH jego izomeryzację do 7a-OOH (szczególnie w środowisku apolarnym).
7. Str. 110, w. 1 od d.: określenie “podczas rozdziału na detektorze elektrochemicznym HPLC” jest nieprecyzyjnym i wprowadzającym w błąd żargonem. Rozdział zachodził na kolumnie HPLC a detekcja z wykorzystaniem detektora elektrochemicznego
8. Nie jest jasne na ile przedstawiony na rys. 55 efekt ochronny inkubacji komórek z DOPA jest wynikiem działania nowopowstałego pigmentu a na ile wprowadzeniem 100 uM zmiatacza ROS (L-DOPA)
9. Str. 118-119: wnioskowanie o mechanizmie reakcji na podstawie punktowego pomiaru wydajności generowania poszczególnych ChOOH jest zawodne ze względu na wydajną izomeryzację 5a- do 7a- oraz ze względu na nieuniknioną wtórną peroksydację lipidów (w tym zależną od PL-OOH wtórną peroksydację Ch). Aby uzyskać bardziej precyzyjne dane należało by przeprowadzić analizę kinetyczną akumulacji poszczególnych ChOOH ze zwróceniem uwagi na pierwotne produkty pojawiające się we wczesnych etapach peroksydacji
10. Jak wytłumaczyć ~ 20 % spadek przeżywalności komórek B16F10 przetrzymywanych w ciemności przez 24 h (Rys. 67 B,D)
11. W Materiałach i Metodach znajduje się podrozdział 3.14.2 Ocena apoptotycznej i nekrotycznej śmierci komórek. W wynikach nie znajdują jednak śladów jej zastosowania.

W dyskusji doktorantka z wnikliwością analizuje uzyskane wyniki eksperymentalne odnosząc je do wyników literaturowych. Szczególnie cenne są krótkie i zwięzłe podsumowania pod koniec każdej z sekcji rozdziału Dyskusja. Kilka poniższych uwag w zupełności nie umniejsza pozytywnej oceny tej części rozprawy:

Str. 145l. 13 od g. efekty His i azydku ilustrują rysunki 31-33 i nie są one słabe, jak stwierdzono w dyskusji, ale całkowicie ich brak, jak ilustrują rys. 31B, 32B i 33

Str. 151 l. 15 od d.: Stwierdzenie: "Można oczekiwać, że warunki w których generowane są stosunkowo długo żyjące rodniki takie jak: rodnik azydkowy, rodnik rodankowy, oraz rodnik siarczynowy, będą przyczyniać się do zwiększenia efektywności terapii fotodynamicznej" może mylnie sugerować, że wymienione rodniki generowane są i mają znaczenie w układach *in vivo*

Str. 152 Warunki, w których bąbelkuje się 1 mM roztwór nadtlenu wodoru argonem, trudno nazwać anaerobowymi

Reasumując, pomimo przedstawionych krytycznych uwag, moja ogólna ocena pracy jest bardzo dobra. Doktorantka zgromadziła imponujący eksperymentalny materiał dowodowy dla uzasadnienia przedstawionych wniosków. Wnoszę zatem do wysokiej Rady Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej o dopuszczenie Pani mgr Anny Kozińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 20.III.2016

Prof. dr hab. Witold Korytowski

