



Katowice

06-05-2020

Dr hab. Robert Musioł prof. UŚ
Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski

Recenzja pracy doktorskiej pana mgr inż. Łukasza Przepisa pt. „Synteza i właściwości pochodnych urydyny modyfikowanych układem fluoroforowym” wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej pod kierunkiem prof. Dr hab. inż. Krzysztofa Walczaka

Opisanie budowy chemicznej kwasów nukleinowych stało się momentem przełomowym w badaniach genetycznych oraz mikrobiologicznych. Poznanie mechanizmów powstawania i przekazywania informacji genetycznej jest niezbędne dla stworzenia podstaw wiedzy w zakresie medycyny oraz farmacji. Jednocześnie specyfika budowy kwasów nukleinowych, w których prostota i skomplikowanie stają się jednością, stawia wysokie wymagania badaczom każdej specjalności. Z punktu widzenia biologii, metody fluorescencyjne są najbardziej wartościowym narzędziem pozwalającym na uzyskanie pożądanej precyzji przy jednoczesnej wszechstronności zastosowań. Również w badaniach kwasów nukleinowych metody fluorescencyjne dają wgląd w mechanizmy, który jest nieosiągalny przy zastosowaniu innych technik. Szczególnie fluorescencyjne sondy molekularne wykazujące podobieństwo do zasad pirymidynowych czy purynowych pozwalające na ich rozpoznanie przez mechanizmy powielania i kontroli DNA stały się ważnym narzędziem w badaniach biochemicznych i mikrobiologicznych. Wysoką wartość tych narzędzi potwierdzają przełomy w naukach biologicznych jakie się za ich przyczyną dokonały oraz ciągłe zainteresowanie jakim cieszą się wśród naukowców. W ciągu ostatnich 20 lat liczba publikacji odnajdywanych po słowach kluczowych „fluorescent probe” sięga kilku tysięcy rocznie. Tematyka ta rozwijana jest



również w uznanym zespole Pana Profesora Krzysztofa Walczaka. Zaś przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr inż. Łukasza Przypisa jest dobrym przykładem takich działań.

Sama praca ma układ klasyczny, w którym wyróżnić można część literaturową, badawczą oraz poprzedzoną szczegółowym podsumowaniem i wnioskami część eksperymentalną. Zarówno wnioski jak i podsumowanie pracy są szczegółowe i dobrze oddają rzeczywiste dokonania autora. Z drugiej strony można odnieść wrażenie, że obie te części ograniczają się jedynie do opisu wyników. Tymczasem wnioski są polem do popisu naukowej świadomości i polotu pozwalając na większą swobodę w formułowaniu myśli i przedstawieniu nie w pełni potwierdzonych tez czy założeń. Szkoda że autor nie skorzystał z tej możliwości.

W pierwszej kolejności zwraca uwagę rozmiar dysertacji liczącej ponad 250 stron, z czego część literaturowa zajmuje niecałe 20%. Na opis badań własnych autor poświęcił blisko 100 stron i nieco mniej miejsca zajmuje część eksperymentalna. W całej pracy, Pan mgr cytuje ponad 400 pozycji literaturowych. W części literaturowej autor, pomimo jej stosunkowo skromnych rozmiarów porusza cały szereg zagadnień związanychz tematem przewodnim pracy. Obok krótkiego rysu historycznego badań nad kwasami nukleinowymi odnaleźć można opis zjawiska fluorescencji oraz metod syntezy, ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych nukleozasad. Dobór faktów oraz sposób ich przedstawienia, a także powiązanie z tłem znanego stanu techniki są spójne i logiczne. Niektóre aspekty zostały jednak przedstawione nazbyt lakonicznie. Przykładowo przy tak dokładnym opisie samego zjawiska fluorescencji oraz cech, jakimi powinien charakteryzować się dobry fluorofor brakuje krótkiego choćby komentarza o fotowysielaniu (blaknięciu) oraz zakresie użytecznej fali wzbudzenia z punktu widzenia badań biologicznych. Zwłaszcza to drugie zagadnienie związane ze zjawiskiem autofluorescencji oraz wpływu fotoindukowanych zmian cząstek biochemicznych na procesy komórkowe ma znaczenie z punktu widzenia projektowania dobrych sond molekularnych o potencjalnych zastosowaniach w biologii. Skrótkowo potraktowane zostały także reakcje Sonogashiry oraz Mizoroki-Hecka które razem liczą kilkanaście linii tekstu. W takiej sytuacji może lepiej byłoby zrezygnować z konstruowania tak krótkich rozdziałów, które z konieczności nie mogą wyczerpywać tematu ważniejszych strategicznie reakcji syntezy



wiązań węgiel-węgiel. Zamiast tego można wspomnieć o nich tak jak ma to miejsce w rozdziale 1.1.1. omawiającym zastosowanie takich reakcji w tematycznych pochodnych urydyny.

Znacznie bardziej rozbudowana część badawcza pracy zawiera wyczerpującą i poprawnie przeprowadzoną dyskusję nad planowaniem i przebiegiem prac syntetycznych oraz pomiarów. Na uwagę zasługuje zwłaszcza krytyczna ocena danych literaturowych oraz umiejętna modyfikacja metod syntezy. Sposób podziału tekstu na prekursorów oraz właściwe koniugaty opatrzone podsumowaniem po każdym rozdziale znacząco przyczynia się do przejrzystości, ułatwia podążanie za tokiem rozumowania autora. Równie dobrze oceniam analizę niepowodzeń. Pan mgr inż. Przypis dokładnie omawia wszystkie te przypadki które pozwoliły mu przekonać się, że czegoś, w zakładany przez Niego sposób, zrobić się nie da. Autor często podejmuje próby optymalizacji procedur syntetycznych. Szkoda że w tym momencie autor nie pokusił się o wykorzystanie metod eksperymentu planowanego na przykład podczas reakcji jodowania pochodnych karbazolu opisanego na stronach 88-100. Tym bardziej że jak sam autor zauważył wyniki otrzymane w trakcie optymalizacji skłoniły go „do ponownego przebadania kwestii jaka ilość katalizatora jest niezbędna do przeprowadzenia reakcji jodowania” oraz jak się okazało „wyniki były zgoła odmienne niż te otrzymane wcześniej”. Wybrana przez autora droga nie tylko zmusza do przeprowadzenia większej liczby prób utrudnia również uzyskanie najlepszych wyników dla całego spektrum parametrów zmiennych.

W opisie warunków reakcji usuwania grupy trimetylosililowej na stronie 110 brakuje trochę odniesienia się w dyskusji do danych literaturowych. Podobne reakcje są już opisane i badania w ramach tej pracy nie były wykonywane w próżni.

Na stronie 130 podano, że pomiary właściwości absorpcyjno-emisyjnych wykonano dla wybranych koniugatów. Jakie były kryteria tego wyboru?

Część eksperymentalna została podzielona typowo dla tego typu prac na opis przygotowania i oczyszczania chemikaliów oraz właściwe procedury otrzymywania poszczególnych związków czy przeprowadzenia pomiarów fizykochemicznych. Na uwagę zasługuje staranność z jaką została ona opracowana. Opisy procedur syntetycznych nie budzą zastrzeżeń, są przejrzyste i kompletne,



a wszelkie odchylenia od metod standardowych zostały wyrazie podane. Powtórzenie badań Pana mgr inż. Przepisa nie powinno nastroczać problemów. Warto też jednak wspomnieć o kilku drobnych dostrzeżonych przeze mnie uchybieniach.

Autor nie zawsze cytuje literaturowe dane dotyczące własności fizykochemicznych otrzymanych przez siebie związków, dotyczy to szczególnie temperatury topnienia. Przykładowo proste pochodne 9-etylokarbazolu (3-metylo, 3-metoksy, itp.) są już znane a ich temperatura topnienia dostępna w literaturze naukowej. Ponadto na stronie 84 autor podczas opisywania problemów otrzymywania 3-amino-9-etylokarbazolu podaje, że udało mu „się zmierzyć faktyczną temperaturę topnienia tego związku, która wyniosła 92-94°C” niestety ignorując fakt istnienia dwóch raportów literaturowych podających odmienne wartości, wyższe o dobre kilkanaście stopni. Można dopatrzeć się też nielicznych na szczęście błędów edytorskich na przykład brak integracji sygnałów w opisie widm NMR (strony 166, 168). Warto jednak podkreślić, że tak część eksperymentalna jak cała rozprawa zostały przygotowane z dużą starannością a liczba uchybień w najmniejszym stopniu nie odbiera przyjemności z podążania za tokiem myśli autora.

Obowiązkiem recenzenta jest zarówno podkreślić zalety pracy, jak i zwrócić uwagę na dostrzeżone błędy. W przypadku przedstawionej mi do recenzji dysertacji te ostatnie dotyczą jedynie edytorskiej części pracy, nie mam natomiast zarzutów merytorycznych. Pod tym względem rozprawa doktorska Pana mgr inż. Łukasza Przepisa stanowi spójne dzieło o znacznej wartości naukowej. Na pochwałę zasługuje zarówno ambitny cel pracy jak i determinacja jaką wykazał się autor w jego osiągnięciu. Z kart pracy jednoznacznie wynika wysoki poziom naukowy doktoranta, samodzielność w formułowaniu i weryfikacji tez naukowych. W ramach pracy otrzymany został szereg nowych pochodnych i analogów nukleinowych koniugatów możliwych do zastosowania jako fluorescencyjne sondy molekularne. W istotnym zakresie przeprowadzono optymalizację i modyfikację dostępnych metod. Wykonane zostały pomiary podstawowych parametrów fotooptycznych otrzymanych układów. Otrzymano oligonukleotydowe sekwencje oraz zbadano stabilność dupleksów z komplementarnymi niciami DNA oraz RNA. Metodami modelowania molekularnego potwierdzono mechanizmy oddziaływań w dupleksach oraz wpływ koniugatów na zachowanie układów nukleinowych. Warto nadmienić, że wyniki badań przyczyniły się do powstania



siedmiu publikacji naukowych w uznanych czasopismach, zgłoszenia patentowego i komunikatów konferencyjnych.

W związku z powyższym, z przekonaniem stwierdzam że doktorant jest w pełni ukształtowanym młodym naukowcem o bogatym doświadczeniu i właściwym podejściu do nauki a przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2016r. poz. 882 i 1311). Dlatego też stawiam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Łukasza Przepisa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Robert Musioł