



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 26 października 2023 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Katedra Biofizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Furso
pt. „Modyfikacja właściwości fotochemicznych bisretinoidów w wybranych
układach modelowych”**

Zgodnie ze statystykami medycznymi, zwyrodnienie plamki żółtej siatkówki oka człowieka związane z wiekiem, nazywane skrótowo AMD (Age-related Macular Degeneration, ang.), stanowi główną przyczynę utraty widzenia precyzyjnego, centralnego i barwnego u pacjentów w starszym wieku i nosi znamiona choroby cywilizacyjnej. Wyniki wieloośrodkowych, randomizowanych badań klinicznych AREDS2, prowadzonych w Stanach Zjednoczonych i polegających na analizie wpływu doustnej suplementacji witaminami i minerałami antyoksydacyjnymi na rozwój zaawansowanego zwyrodnienia plamki żółtej dowiodły, iż w znacznym stopniu etiologia AMD związana jest z aktywnością oksydacyjną, w tym fotooksydacyjną, w błonach fotoreceptorów, oraz potencjalnie w nabłonku barwnikowym siatkówki (RPE). Oczekuje się, iż dokładne poznanie mechanizmów molekularnych leżących

u podstaw procesów oksydacyjnych w strukturach siatkówki oraz, przede wszystkim ograniczenie aktywności reaktywnych form tlenu otworzy drogę do aktywnego zapobiegania bądź nawet leczenia AMD. Wobec faktu, iż bisretinoidy, stanowiące główny przedmiot projektu doktorskiego pani mgr Justyny Furso, należą do klasy związków podejrzewanych o aktywność pro-oksydacyjną, zarówno w błonach fotoreceptorowych siatkówki jak i RPE, podjętą w ramach projektu doktorskiego tematykę badawczą postrzegam jako wyjątkowo aktualną oraz ważną, zarówno w aspekcie poznawczym jak i aplikacyjnym.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem pana prof. dra hab. Tadeusza Sarny. Rozprawa doktorska zredagowana została w języku polskim, na 138 stronach standardowego maszynopisu, w oparciu o logiczny i przejrzysty układ. Po informacjach dotyczących finansowania prowadzonych badań w ramach projektu PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki oraz informacjach o dorobku publikacyjnym Doktorantki, zamieszczone zostały Spis treści oraz Wykaz najważniejszych skrótów. Rozprawę otwiera rozdział 1. „Wprowadzenie” zredagowany na zasadzie przeglądu literaturowego doniesień związanych bezpośrednio z tematyką bisretinoidów, ich strukturą chemiczną, metabolizmem oraz możliwymi funkcjami fizjologicznymi w oku człowieka. W moim odbiorze, odniesienia do najbardziej aktualnego piśmiennictwa, pomysłowe grafiki i schematy oraz zakres prezentowanych treści czynią ten rozdział doskonałą lekturą, adresowaną nie tylko studentom oraz adeptom nauki, ale również specjalistom z dziedzin pokrewnych. Cele projektu doktorskiego, zarówno ten strategiczny jak i cząstkowe, sformułowane zostały w ramach jednostronicowego rozdziału 2. pt. „Cele pracy”. Część eksperymentalną rozprawy otwiera rozdział 3. pt. „Materiały i metody”, zgodnie z zapowiedzią przedstawiający czytelnikowi zestawienia stosowanych materiałów i odczynników oraz wprowadzający w tajniki procedur pomiarowych oraz ustawień aparaturowych. W tym miejscu swojej analizy chciałbym zatrzymać się na chwilę, aby zwrócić uwagę na wieloaspektowe podejście do problemów

rozwiązywanych w ramach realizacji projektu doktorskiego, przejawiające się, między innymi, na doborze wielu technik badawczych, umożliwiających formułowanie oraz rozwiązywanie różnorodnych specyficznych problemów badawczych. Prowadzone w ramach realizacji projektu doktorskiego prace obejmowały, między innymi, badania prowadzone z zastosowaniem techniki spektroskopii fluorescencyjnej, oksymetrii EPR, analiz pułapkowania spinowego, laserowej fotolizy błyskowej, radiolizy impulsowej oraz podejścia znaczników spinowych EPR w badaniach właściwości strukturalnych oraz dynamicznych modelowych błon lipidowych. W mojej opinii, stopień precyzji informacji zawartych w rozdziale „Materiały i metody” odpowiada w pełni standardom międzynarodowym stosowanym w pracach eksperymentalnych. Eksperymenty prowadzone w ramach realizacji projektu doktorskiego przedstawione zostały w rozprawie w ramach rozdziału 4. pt. „Wyniki”. Struktura tego rozdziału odzwierciedla kolejne zadania badawcze, uszeregowane systematycznie w logiczny ciąg, w którym w pierwszej kolejności uwaga zogniskowana była na badaniach bisretinoidu pirydynowego (A2E), w dalszej kolejności dimeru całkowicie-*trans* retinalu (dimer ATR). Wśród realizowanych zadań badawczych znalazły się, między innymi, analizy widm absorpcyjnych w zakresie Uv-Vis (prowadzone również w kontekście fotowybielania bisretinoidów), pomiary fotokonsumpcji tlenu, analizy pułapkowania spinowego EPR ukierunkowane na monitorowanie fotogeneracji wolnych rodników, analizy widm emisji fluorescencji wykorzystywanych do badania oddziaływania bisretinoidów ze środowiskiem białkowym albuminy (BSA), detekcja tlenu singletowego w oparciu o specyficzną luminescencję w obszarze widmowym podczerwieni oraz spektroskopowe badania realizowane z zastosowaniem laserowej fotolizy błyskowej i elektronowej radiolizy impulsowej. Równolegle z prezentacją wyników, Autorka rozprawy zamieszczała ich wstępną analizę oraz klasyfikację. Bardzo szczegółowa i wieloaspektowa dyskusja wyników przedstawiona została w ramach kolejnego rozdziału (5., pt. „Dyskusja”). W moim odbiorze, dyskusja wyników przeprowadzona została w sposób wyjątkowo wszechstronny i ostrożny, ze znaczną dozą krytycyzmu, ukazując dojrzałość naukową Kandydatki. Osobiście, szczególnie

spodobały mi się fragmenty dotyczące możliwości generowania stanów trypletowych bisretinoidów oraz ich potencjalnego pośrednictwa w fotouczulanej generacji tlenu singletowego. Według koncepcji Doktorantki, najważniejsze Jej zdaniem osiągnięcia pracy doktorskiej zestawione zostały w punktach, w ramach rozdziału 6. pt. „Wnioski końcowe”. W pełni zgadzam się z tezami tego zestawienia. W mojej opinii, szczególnie ważne oraz interesujące są rezultaty wskazujące na fakt, iż fotoreaktywność A2E oraz dimeru ATR jest istotnie niższa niż ta obserwowana w przypadku całkowicie-*trans* retinalu. Może to wskazywać na mechanizm protekcyjny funkcjonujący w ramach membran fotoreceptorów, polegający na przejściowej syntezie bisretinoidów. Równie interesującym, w aspekcie odkrywania specyficznych mechanizmów molekularnych związanych z funkcjonowaniem bisretinoidów w siatkówce, wydaje się być obserwacja, iż ich fotoreaktywność zdominowana jest procesami wolnorodnikowymi, chociaż w przypadku A2A znacząca jest również ścieżka włączająca tlen singletowy. Rozprawę zamyka „Streszczenie” zredagowane jako rozdział 7. oraz zestawienie cytowanego piśmiennictwa, w ramach rozdziału 8. pt. „Literatura”.

Na podkreślenie zasługuje również bardzo wysoka jakość warstwy językowej, strony edytorskiej oraz szaty graficznej rozprawy. W trakcie jej lektury nasunęły mi się nieliczne pomysły, które mógłbym przedstawić Doktorantce w formie moich rekomendacji. Poniżej ich krótka lista:

1. Często w piśmiennictwie naukowym w języku polskim nazwę konfiguracji molekularnej „*all-trans*” podaje się jako „całkowicie-*trans*”, chociaż zgadzam się z Doktorantką, że najważniejsza w tym przypadku jest konsekwencja w obrębie całego tekstu.
2. Str. 21, w ostatnim akapicie: do wielkości molowego współczynnika ekstynkcji (ϵ) proponuję podawać jednostki ($M^{-1}cm^{-1}$).
3. Str. 47, 6. wiersz od dołu: raczej „hipsochromowe” zamiast „hipochromowe”.

4. W obrębie całej rozprawy (przykładowo str. 48, 56, 59,...), proponuję na osi odciętych wykresów prezentujących widma podawać również wielkość fizyczną, czyli „Długość fali”, nie zaś tylko jednostki „nm”.
5. W przypadku osi rzędnych wykresów prezentujących zależności czasowe (np. str. 80, 81, 83, 84), proponuję przed jednostkami (μs) podawać nazwę wielkości fizycznej, czyli „Czas”.
6. W przypadku wykresów prezentujących widma fluorescencyjne (np. str. 56, 57, 58), proponuję nazwę osi rzędnych w formie „Intensywność fluorescencji” zamiast „Fluorescencja”, zgodnie z zasadą: wielkość fizyczna raczej niż samo zjawisko.

Jak już wspomniałem powyżej, w mojej opinii rozprawa doktorska pani mgr Justyny Furso jest opracowaniem wyjątkowo obszernym i wielowątkowym, ożywiającym ciekawość poznawczą. Przejawem tego mogą być sformułowane poniżej problemy:

1. Analizując strukturę bisretinoidów zauważyć można, iż połączone cząsteczki zawierają dwa elementy sprzężonych układów wiązań podwójnych C=C, na przykład dla Dimeru ATR, składających się z fragmentów $n=6$ plus C=O oraz $n=4$. Na istnienie dwóch niezależnych przejść elektronowych odpowiadających tym różnym układom wiązań sprzężonych wskazuje również „dwuskładnikowy” kształt widm absorpcyjnych, z maksimami pasm w rejonie 290 nm oraz 430 nm. Czy możliwe jest, iż mamy również do czynienia z dwoma niezależnymi poziomami trypletowymi?
2. Uważam za bardzo cenną dyskusję uwzględniającą anihilację stanów trypletowych bisretinoidów w interpretacji obserwowanych efektów kinetycznych. Ciekaw jestem, czy możliwe jest również, iż w analizowanych

procesach znaczenie ma rozszczepienie wzbudzenia singletowego cząsteczki na dwa wzbudzenia trypletowe (tzw. singlet fission)?

3. Wyniki badań wskazują, iż kompleksowanie bisretinoidów ze środowiskiem białkowym albuminy wołowej powoduje przeciwstawne efekty w analizach fotowysielania: przyspieszenie w przypadku A2E oraz spowalnianie w przypadku dimeru ATR. Ciekaw jestem jakie mogą być przyczyny tej interesującej różnicy.

4. Bardzo interesujące wydaje mi się porównanie wyników badań obliczeniowych Dynamiki Molekularnej oraz badań prowadzonych z zastosowaniem znaczników spinowych, ukierunkowanych na analizy właściwości strukturalnych i dynamicznych błon lipidowych. W przypadku błon naturalnych siatkówki oka bisretinoidy występują w środowisku lipidowym obok karotenoidów luteiny oraz zeaksantyny. Ciekaw jestem, czy zdaniem Doktorantki, oddziaływania wzajemne tych sąsiadujących cząsteczek mogą mieć znaczenie w aktywności regulacyjnej w domenie fotochemicznej oraz strukturalnej?

Konkluzja

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Justyna Furso przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie wyników szeregu badań eksperymentalnych, precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych. W świetle interpretacji uzyskanych wyników oraz ich wieloaspektowej dyskusji Doktorantka jawi się jako dojrzała i obdarzona erudycją

badaczka. Obszerna część uzyskanych rezultatów zamieszczona została w dwóch artykułach specjalistycznych, opublikowanych ze współautorstwem Kandydatki.

Moim zdaniem, przedstawiona przez panią mgr Justynę Furso rozprawa doktorska zawiera rozwiązania bardzo aktualnych oraz istotnych z poznawczego punktu widzenia problemów naukowych, wnosi do nauki światowej znaczący postęp, spełniając tym samym warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164 poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Justyny Furso do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Uwzględniając bardzo szeroki zakres przeprowadzonych prac badawczych, rangę uzyskanych wyników naukowych oraz ich znaczenie w zrozumieniu etiologii zwyrodnienia plamki żółtej związanej z wiekiem, wnoszę również o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej rozprawy doktorskiej jako wyróżniającej.

