

Toruń, 2020.03.25

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Ilony Marszałek pt. „Ternary complexes of fluorescent sensors for zinc ions” wykonanej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Bala**

Ze względu na szerokie zastosowanie związków luminescencyjnych na wielu polach ludzkiej działalności ich rozwój jest stale podtrzymywany przez coraz to nowe wyzwania stawiane nauce. Już samo codzienne użycie związków elektroluminescencyjnych jest kluczowe dla cywilizacji i każdego z jej członków. To samo dotyczy innych zastosowań, a te związane z szeroko rozumianą biochemią i medycyną w obecnych czasach są szczególnie ważne. Szczególne miejsce zajmuje tu analityka medyczna oraz wyzwania stojące na drodze do lepszego zrozumienia zachodzących procesów jak i, co równie ważne, szczegółowego ich zrozumienia w sensie ilościowym. W tym miejscu pole badawcze zostaje oddane w dużej części chemikom, których zadaniem jest opracowywanie nowych związków jakie będą przydatne w szeroko rozumianej analityce.

Jak w przewodniku zostało to omówione, używanie sond fluorescencyjnych bez dokładnej wiedzy na temat ich oddziaływania z innymi związkami może prowadzić do otrzymania błędnych danych. To, w konsekwencji, uprawnia do stwierdzenia, że również działania medyczne podjęte na podstawie takich wyników mogą być obarczone błędem większym niż wynika to z badań statystycznych. Stąd, moim zdaniem, wyniki przedstawione przez Autorkę rozprawy wpisują się w obecny trend związany z kilkoma obszarami nauki, a należą tu fotofizyka sond spektroskopowych, chemia supramolekularna i analityka biochemiczna. W swojej pracy naukowej Autorka skupiła się na badaniach popularnych obecnie sond nadających się do oznaczania jonów cynku w płynie komórkowym. Do tych barwników należą FluoZin-3, Zinpyr-1 i Zinbo-9. Jednak, celem nadrzędnym

i najwartościowszym z naukowego punktu widzenia były badania konkurencyjności wiązania cynku z samą sondą oraz oddziaływanie takiego kompleksu z innymi małymi cząsteczkami organicznymi jakie znajdują się w przestrzeni komórkowej. Do tych cząsteczek należały jon cytrynianowy, octanowy, ATP, histydyna, glicyna, kwas glutaminowy oraz glutation w formie zredukowanej oraz w formie disiarczku.

Na dorobek mgr inż. Ilony Marszałek składa się w sumie osiem publikacji z czego trzy omówione w przewodniku stanowią tematycznie spójną całość. W samym przewodniku prezentowane badania zostały wystarczająco opisane, aby nadać czytającemu pewien sposób myślenia o wynikach. Szczegółowe omówienie wyników prac zostało opublikowane w załączonych pracach tj.

1. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2016) **161**, 107-114
2. *Inorganic Chemistry* (2018) **57**, 9826-9838
3. *Inorganic Chemistry* (2019) **58**, 14741-14751.

Mgr inż. Ilona Marszałek prezentowała wyniki prac również na konferencjach międzynarodowych.

### **Treść przewodnika**

Sam przewodnik składa się z 62 stron tekstu w tym 4ch tabel, 8iu rysunków oraz 111 pozycji literaturowych. Tekst jest napisany jasnym i klarownym językiem, choć Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów. I tak:

1. Autorka nie zdefiniowała pewnych skrótów, mimo tego, że w treści konsekwentnie ich używa. Domyślam się, że jest to spowodowane pewną ich uniwersalnością w środowisku naukowym zajmującym się biochemią.
2. Użycie w przewodniku stwierdzenia „tightly bound” i „loosely binding” są określeniami intuicyjnie rozumianymi, ale nie definiują granicy między nimi. Myślę, że wygodniej byłoby, gdyby za tymi stwierdzeniami stały liczby, które w jakiś sposób je doprecyzowują. Tymczasem w tekście pojawiają się jedynie zakresy femto-nano oraz mikro-mili w sensie stałych dysocjacji omawianych kompleksów, a odnoszące się do słów *tightly* i *loosely*. *Miejsce: strona 18.*
3. Jedno z kryteriów możliwości zastosowania mechanizmu fotoindukowanego przeniesienia elektronu w badaniach mówi, zdaniem Autorki, o *stabej efektywności*

(„poor”) przejścia singlet-tryplet. W tym przypadku właściwiej byłoby powiedzieć o *niskiej efektywności* przejścia międzysystemowego. *Miejsce: strona 27.*

4. Na tej samej stronie (27) opis częściowej dysocjacji kompleksu jonu cynku i użytej sondy i zastąpienie fragmentu sondy cząsteczką wprowadzonego ligandu jest niefortunny, ale zrozumiały po ponownej lekturze. Chodzi o fragmenty „addition of an additional ligand” oraz „disconnection of the individual nitrogen or oxygen ligand”, które wraz z opisem alternatywnego mechanizmu oddziaływania tworzą dość zawiły do zrozumienia fragment.

W tym miejscu zaznaczam, że następna część przewodnika, dotycząca hipotezy badawczej oraz samego problemu naukowego jest napisana z większą starannością, a jej lektura sprawiła mi niekłamaną przyjemność.

Kontynuując jednak komentarze...

5. Autorka używa terminu „cząsteczki cynku” (*zinc molecules*) w tytule tabeli 3. Być może jest to zwykła pomyłka lub skrót myślowy zmierzający do powiedzenia „jonów cynku”, a jeśli nie to proszę o wyjaśnienie. *Miejsce: strona 35.*
6. W tekście pojawiają się struktury używanych barwników wraz ze związanym przez nie jodem cynku. Jednak, Autorka pisze, że są one „domniemane” (*putative*).
  - a. Czy istnieją jakieś racjonalne podstawy takich domniemań?
  - b. Dodatkowo zwracam uwagę, że struktura Zinpyr-1 w dwoma jonami cynku została w pracy źródłowej [*J. Am. Chem. Soc.* (2001) **123**, 7831-7841] rozwiązana i przedstawiona w postaci diagramu ORTEP. Stąd, kompleks ten posiada określoną geometrię, która przestaje być „domniemana”. *Miejsce: strona 38 i 39.*
7. W tekście pojawiły się też pewne pomyłki językowe, takie jak:
  - a. na stronie 46 pojawia się *sila kompleksu* („strength of such complexes”),
  - b. na stronie 47 *skuteczność fluorescencji* („fluorescence efficacy”) podczas gdy jasnym i precyzyjnym jest *wydajność kwantowa fluorescencji* (*fluorescence quantum yield*).

Powyższe pomyłki nie pogarszają możliwości zrozumienia tekstu, tak więc, nie wpływają na jakość naukową pracy, a jedynie sugerują nieco większą ostrożność w jego iterowaniu.

## Treść załączonych publikacji

Przedstawiona praca doktorska składa się z trzech publikacji. Pozwolę sobie skomentować wyniki badań w kolejności w jakiej te prace były omawiane przez Autorkę.

### **Publikacja** *Journal of Inorganic Biochemistry* (2016) **161**, 107-114

Praca skupiona jest na przedstawieniu wyników pomiarów związanych z weryfikacją danych poprzednio publikowanych przez innych autorów, doprecyzowaniu ich oraz badaniach barwnika FluoZin-3 w zmieniającym się pH przy zastosowaniu stężenia mikromolowego. Wyniki były uzyskane z użyciem dwóch technik pomiarowych. Lektura pracy nasuwa, jednak, pytania i komentarze.

1. Autorka, na podstawie swoich badań, stwierdziła, że FluoZin-3 nie jest stabilną cząsteczką przy pH poniżej wartości 4. Przy dyskusji tego faktu powołuje się na pracę 22 [*Journal of Nutritional Biochemistry* (2011) **22**, 79–88] jako na pracę źródłową twórców FluoZin-3. Tu nastąpiła pomyłka, ponieważ oryginalną pracą twórców jest praca w *Journal of American Chemical Society* (2002) **124**, 776-778. Co więcej, w tej publikacji pracy autorzy wykonali pomiary fluorescencji kompleksu FluoZin-3:Zn<sup>2+</sup> w zmiennym pH i wykazali (suplement do publikacji), że przy pH około 4 fluorescencja zanika. Jednak, w tejże pracy nie było mowy o rozkładzie samego barwnika FluoZin-3 przy niskim pH, na co powołuje się Autorka dysertacji. Tak więc, wyniki jakie Autorka przedstawiła w suplemencie do omawianej publikacji (spektrometria mas, rysunek S3 suplementu) są oryginalnymi i wartościowymi danymi.
2. Autorka opisując miareczkowania podaje następujące procedury:
  - a) miareczkowanie równomolowego kompleksu FluoZin-3:ZnCl<sub>2</sub> za pomocą NTA (kwas nitrylotriooctowy)
  - b) miareczkowanie pH metryczne mieszaniny FluoZin-3:EDTA za pomocą kwasu solnego.

Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w tych eksperymentach zamieniono NTA na EDTA.

Inne uwagi jakie nasuwają się podczas lektury tej publikacji to:

1. Błąd na rysunku 1, gdzie kolorem czarnym zaznaczono nie wynik pomiaru dla barwnika FluoZin-3 lecz jego kompleksu z cynkiem.

2. Dla rysunku 2 poziomą linią przerywaną zaznaczono absorpcję FluoZin-3 bez dodatku  $ZnCl_2$  czy NTA. Podobne stwierdzenie (linia przerywana) pojawia się pod rysunkiem 4 lecz odnosi się do fluorescencji. Jednak, na tym rysunku brakuje poziomej, przerywanej linii.
3. W tytule tabeli 2 zostało wspomniane, że wartości odchyleń standardowych podano w nawiasach. Brak jest tychże nawiasów. Jest to pewna niekonsekwencja.
4. W tekście pracy jest powiedziane, że FluoZin-3 jest niestabilny przy niskich pH tracąc grupę metylenokarboksyłową połączoną z atomem azotu. W takim przypadku może być to każda z trzech grup. Dodatkowe pomiary NMR dać mogły odpowiedź na pytanie, w którym miejscu zachodzi ta reakcja. Byłaby to cenna informacja dla przyszłych starań dotyczących syntezy nowych sond. Czy takie dane są dostępne?

**Publikacja *Inorganic Chemistry* (2018) 57, 9826-9838**

Publikacja ta prezentuje bardzo ważne wyniki dotyczące konkurencyjności oddziaływania FluoZin-3 z cynkiem oraz innymi cząsteczkami jakie znajdują się w komórkach, a jakie mogą kompleksować tak jony cynku, jak i asocjować z kompleksem cynku z barwnikiem FluoZin-3. Co do wyników nie mam praktycznie uwag. Jedyne pytanie jakie mi się nasuwa to czy w omawianych kompleksach możliwym jest (i czy było brane po uwagę) deprotonowanie grupy NH przez anion kwasu octowego?

**Publikacja *Inorganic Chemistry* (2019) 58, 14741-14751.**

Publikacja, podobnie do poprzedniej, prezentuje wyniki dotyczące konkurencji wiązania cynku przez sondy spektralne. Do tego celu użyto sondy podobne co do zastosowań (oznaczanie cynku) lecz różniących się strukturalnie od najczęściej używanej cząsteczki barwnika FluoZin-3. Publikacja jest nie tylko zbiorem danych, ale też zbiorem wyjaśnień zjawisk, które mają kluczowe znaczenie dla funkcjonowania wybranych sond fluorescencyjnych. Jednocześnie jest ona najbardziej zaawansowana łącząc pomiary eksperymentalne z symulacjami matematycznymi wykonanymi dla serii związków. Praktycznie nie mam żadnych krytycznych uwag do prezentowanych w niej wyników.

## Uwagi ogólne i pytania.

Podczas lektury przewodnika i załączonych publikacji z niemałą satysfakcją zauważyć się da jaką drogę naukową w sensie podjętych tematów badawczych, pod okiem Promotora, przebyła Autorka. Jest bardzo miło widzieć, że tematyka badań ewoluowała nie tylko w sensie nauk podstawowych, ale też praktycznego użycia uzyskanych wyników oraz wyciągnięcia wniosków, które są znaczące dla wielu grup naukowych zajmujących się biochemią.

Pozostaje jedynie zadać ogólne pytania, które nasunęły się w podsumowaniu.

1. Czy Autorka próbowała wykonać miareczkowania NMR dla interesujących ją kompleksów? Z takich eksperymentów można uzyskać pewne informacje strukturalne.
2. Czy z danych NMR jakie Autorka posiada wynika w jakikolwiek sposób geometria dla kompleksu FluoZin-3 z cynkiem?
3. W publikacjach Autorki jest co prawda mowa o widmach NMR, ale te nie zostały zamieszczone w pracach ani suplementach, ani też nie podano żadnych informacji na temat tych wyników. Jedyną jest ta mówiąca o oddziaływaniu cząsteczki FluoZin-3 z cynkiem, lecz wyniki tych pomiarów nie zostały zamieszczone. Co było powodem takiej decyzji, skoro dr Zhukow, wykonujący pomiary, jest współautorem pracy w *Journal of Inorganic Biochemistry* (2016)?
4. Jedno stwierdzenie nie jest dla mnie jasne. Proszę o wyjaśnienie zdania ze strony 50 przewodnika „It thus becomes highly probable that all cellular free zinc is in fact complexed.” Jeśli tak jest w istocie to o jakich kompleksach Autorka myśli?
5. W spisie literatury, moim zdaniem, brakuje dość ważnej pozycji, w której autorzy opisują „klasyczne sondy używane w oznaczaniu jonów magnezu i wapnia zaadoptowane na potrzeby analizy cynku”. Jest to praca przeglądowa *Coordination Chemistry Reviews* (2004) **248**, 205-229.

Wymienione w mojej opinii pomyłki lub niedociągnięcia nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam wysoko.

Podsumowując, cykl prac jakie opublikowała mgr inż. Ilona Marszałek wnoszą bardzo wartościowe treści do badań oddziaływania sond fluorescencyjnych używanych w oznaczaniu jonów cynku, a szczególnie korygują dotychczasowe wyniki innych grup. Rozwikłanie skomplikowanej równowagi jaka zachodzi między cząsteczką sondy, jonami cynku oraz innymi, obecnymi w dużej ilości w komórkach, cząsteczkami to dobry krok na drodze nie tylko do lepszego zrozumienia samych zjawisk, ale także do poprawienia wielu procedur związanych z analityką biochemiczną.

Z pełnym przekonaniem i spokojnym sumieniem rekomenduję dopuszczenie mgr inż. Ilony Marszałek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stwierdzam, że przedstawiony cykl prac spełnia wymogi zwyczajowe i formalne stawiane przewodom doktorskim w myśl obowiązujących przepisów.

dr hab. inż. Borys Ośmiałowski, prof. uczelni