



Kielce, 16.06.2021 r.

Dr hab. Sławomir Michałkiewicz prof. UJK

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Kamili Morawskiej

pt. „Wykorzystanie technik woltamperometrycznych w elektroanalizie i badaniach interakcji DNA”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana Zakładzie Analizy Instrumentalnej Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Witolda Ciesielskiego jako promotora oraz przy udziale Pani dr Sylwii Smarzewskiej jako promotora pomocniczego.

Recenzję sporządzono na zlecenie Pani prof. dr hab. Sławomiry Skrzypek, Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego (pismo z dnia 28.04.2021 r.) na podstawie przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Wprowadzenie

Rozprawę doktorską Pani mgr Kamili Morawskiej stanowi cykl czterech spójnych tematycznie prac opublikowanych w renomowanych czasopismach indeksowanych w bazie JCR: Journal of Electroanalytical Chemistry, Bioelectrochemistry, Food Chemistry i Electroanalysis. Sumaryczny Impact Factor prac stanowiących osiągnięcie naukowe Doktorantki wynosi 17.379, a liczba punktów MNiSW - 440. Dane te zasługują na uznanie zważywszy na fakt, że ich opublikowanie przypada na ostatnie dwa lata (2020 i 2021). W trzech pracach opatrzonych w dorobku naukowym numerami 1-3 Pani mgr Kamila Morawska jest pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondencyjnym. Z analizy danych zawartych w oświadczeniach współautorów publikacji wynika, że udział Doktorantki w powstanie prac był znaczący i wzrastał od 35%, przez 50, 70 do 80%. W dorobku naukowym Doktorantki są jeszcze trzy prace opublikowane w indeksowanych czasopismach: Sensors (2020 r.), Environmental Chemistry Letters (2019 r.), Bioelectrochemistry (2018 r.) oraz jedna przygotowana do druku. Sumaryczny IF tych prac wynosi 13.919, a liczba punktów MNiSW: 300. Pani mgr Kamila Morawska była również współautorką jednej publikacji pokonferencyjnej oraz sześciu rozdziałów w monografiach, w tym jednego opublikowanego w Wydawnictwie Elsevier (2021 r.). Wyniki swoich badań prezentowała na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci doniesień ustnych (14 wystąpień) i w postaci posterów (11 prezentacji). Doktorantka doskonaliła warsztat naukowy odbywając cztery staże zagraniczne w Rumunii i na Węgrzech. O postępującym rozwoju naukowym Pani mgr Kamili

Morawskiej świadczy również powierzenie Jej obowiązków recenzenta dwóch publikacji w renomowanym czasopiśmie *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

Podsumowując charakterystykę sylwetki naukowej Pani mgr Kamili Morawskiej stwierdzam, że Jej dane bibliometryczne obejmujące siedem opublikowanych prac o sumarycznym IF wynoszącym 31.298 i liczbie punktów MNiSW 740, liczbie cytowań (bez autocytowań) według stanu na dzień 21.05.2021 r.: 22 oraz Indeksie Hirsha; 3 są jak na młodą osobę imponujące, potwierdzają zaangażowanie w pracę naukową i są bardzo dobrym prognostykiem na przyszłość.

Ocena formalno-merytoryczna pracy

Tematyka badawcza Pani mgr Kamili Morawskiej dotyczy zastosowania technik woltamperometrycznych w elektroanalizie wybranych związków chemicznych zaliczanych do pestycydów (laktofen i metoksyfenozyd), leków (lamotrygina) oraz naturalnych antyutleniaczy (sezamol). Doktorantka postawiła przed sobą dwa ściśle określone cele. Pierwszy z nich dotyczył opracowania woltamperometrycznych metod ich oznaczania z zastosowaniem techniki fali prostokątnej (SWV) oraz określenie właściwości elektrochemicznych przy użyciu woltamperometrii cyklicznej (CV). Badania były realizowane w roztworach wodnych o zoptymalizowanym składzie: w kwasie solnym, w buforach Brittona-Robinsona, boranowym, w chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS) na elektrodach pracujących wykonanych ze szklatego węgla (GCE), diamentu domieszkowanego borem (BDDE) i srebra z odnawialnym filmem amalgamatu srebra (Hg(Ag)FE). Opracowane procedury cechuje wysoka czułość oraz niskie granice wykrywalności i oznaczalności. Podjęcie tej tematyki jest według mnie uzasadnione i wpisuje się w nurt poszukiwania nowych, skutecznych i precyzyjnych metod identyfikacji i oznaczania związków biochemicznie czynnych, szczególnie takich, które mogą stanowić zagrożenie dla człowieka i środowiska naturalnego. Drugim celem naukowym Doktorantki była analiza interakcji z DNA tych spośród badanych substancji, które przenikają do środowiska i stanowią potencjalne zagrożenie szczególnie dla organizmów wodnych. Jest to zagadnienie bardzo istotne i dotyczy wyjaśniania mechanizmu terapeutycznego i toksycznego oddziaływania leków i innych substancji biochemicznie czynnych z układami biologicznymi, szczególnie z kwasami nukleinowymi. Takie interakcje mogą prowadzić do zmiany konformacji DNA, przerwania procesu transkrypcji i mutacji genów. Do wyjaśniania tego typu oddziaływań stosowane są różnorodne techniki pomiarowe, głównie chromatograficzne i spektroskopowe. W ostatnich latach, jak pisze Doktorantka w swoich pracach, wzrasta zainteresowanie badaniami elektrochemicznymi ukierunkowanymi na wyjaśnienie oddziaływania leków i innych molekuł z DNA. Wynika to z ich wysokiej czułości i selektywności oraz stosunkowo niewielkich kosztów. Najważniejsze jest jednak podobieństwo pomiędzy reakcjami elektrodowymi i procesami redoks zachodzącymi w żywych organizmach. W wyjaśnianiu interakcji pomiędzy DNA i substancjami biochemicznie czynnymi z zastosowaniem technik woltamperometrycznych ma zatem swój udział Doktorantka i cały zespół Pana Profesora Witolda Ciesielskiego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 102 strony i rozpoczyna się spisem treści oraz wykazem skrótów stosowanych w tekście. Główną jej częścią jest 30-stronicowy autoreferat, w którym Doktorantka w sposób niezwykle syntetyczny przedstawiła wyniki badań opublikowane w cyklu czterech spójnych tematycznie prac będących podstawą do ubiegania

się o stopień doktora nauk chemicznych. W bibliografii są one opatrzone kolejno numerami 18, 24, 31 i 32, a w dorobku naukowym autorki widnieją pod numerami odpowiednio 3, 2, 4 i 1. Konstrukcja autoreferatu jest przemyślana, a treści są prezentowane w blokach tematycznych dotyczących wszystkich analizowanych substancji, bez omawiania każdej z prac stanowiących osiągnięcie naukowe. Dzięki takiemu podejściu możliwe było przedstawienie wielu wyników w rozdziale o niewielkiej objętości. W mojej ocenie brakuje jednak nieco odrębnego podejścia do każdej z publikacji, a szczególnie omówienia wyników prezentowanych w postaci tabelarycznej. Autoreferat rozpoczyna się wstępem, w którym Doktorantka zwraca uwagę na postępującą „chemizację” otoczenia mierzoną gwałtownym wzrostem liczby nowych związków chemicznych i związane z tym zagrożenia dla organizmów żywych i środowiska. Uzasadnia to konieczność rozwijania metod chemii analitycznej i opracowywania nowych selektywnych i czułych procedur analitycznych, w tym również elektroanalitycznych. Mogą one być także z powodzeniem stosowane do badania interakcji z kwasem deoksyrybonukleinowym (DNA). W drugiej części autoreferatu Doktorantka przedstawiła tematykę i cel badań, które obejmują aspekt analityczny związany z opracowaniem woltamperometrycznych metod oznaczania wybranych analitów oraz analizę interakcji związków-DNA prowadzoną dla substancji przenikających do środowiska i szczególnie niebezpiecznych dla organizmów wodnych. Badania były prowadzone technikami fali prostokątnej i woltamperometrii cyklicznej na elektrodach pracujących wykonanych z różnych materiałów: szklatego węgla, amalgamowanego srebra czy diamentu domieszkowanego borem. W dalszej części autoreferatu Doktorantka przedstawiła obiekty swoich badań. Zalaży się tu informacje na temat ich struktury, właściwości, występowania i zastosowania wraz z odpowiednimi odnośnikami literaturowymi. Autorka przypisała również prace własne do omawianych obiektów badań. W kolejnych fragmentach tej części rozprawy autorka przedstawiła układ pomiarowy ze szczególnym uwzględnieniem elektrod pracujących, elektrody odniesienia i pomocniczej. Zasadnicza część autoreferatu dotyczy woltamperometrycznej analizy wybranych substancji biologicznie czynnych. Autorka omówiła kolejno badania wstępne zmierzające do doboru optymalnego do badań poszczególnych analitów elektrolitu podstawowego i jego odczynu, parametrów techniki fali prostokątnej (SWV): amplitudy, częstotliwości, kroku potencjału, a w przypadku laktofenu również czasu zateżania. Nie znalazłem tu jednak informacji uzasadniających dobór materiału elektrody pracującej dla badanych analitów. Jedyna informacja na ten rodzaju stosowanej elektrody jest zawarta w tabelach zbiorczych. W dalszej części autorka przedstawiła wyniki walidacji opracowanych procedur analitycznych uwzględniające zakresy liniowości, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) oraz analityczne zastosowanie opracowanych procedur do oznaczania badanych substancji w próbkach rzeczywistych: w oleju sezamowym, w próbkach wody wodociągowej i rzecznej oraz w soku z winogron. Wyjątkiem była lamotrygina, w przypadku której pominięto aspekt analityczny. Z danych zamieszczonych w tabeli 4 wynika, że opracowane metody pozwalają oznaczać badane anality na niskich poziomach stężeń sięgających w przypadku laktofenu 3×10^{-8} mol L⁻¹ przy odzyskach rzędu 96 – 105% i z precyzją 2.5 – 8.0%. Ta część autoreferatu zawiera również informacje na temat selektywności opracowanych procedur oznaczania laktofenu i metoksyfenozydu.

Kolejną część autoreferatu Doktorantka poświęciła badaniom procesów elektrodowych z udziałem analitów i przedstawiła informacje możliwe do uzyskania na podstawie analizy

krzywych CV: określenie stopnia odwracalności procesu elektrodowego, jego dyfuzyjnego bądź adsorpcyjnego charakteru. Z analizy danych zamieszczonych w tabeli 5 wynika, że w przypadku każdego z analitów badany proces ma charakter nieodwracalny i dyfuzyjny lub dyfuzyjno-adsorpcyjny (laktofen). Doktorantka nie komentuje jednak wyników i nie podaje dowodów potwierdzających nieodwracalność procesu. Ze względu na to, że woltamperometryczna analiza badanych substancji opiera się na ich właściwościach elektrochemicznych, ten fragment autoreferatu powinien według mnie poprzedzać część analityczną.

W ostatniej części prezentacji wyników Pani mgr Kamila Morawska przedstawiła problematykę interakcji lamotryginy, laktofenu i metoksyfenozydu z DNA. Badania były prowadzone technikami woltamperometrycznymi (SWV i CV) oraz z zastosowaniem spektrofotometrii UV-Vis i obejmowały oddziaływania z dwuniciowym DNA, a w przypadku lamotryginy również z jednoniciowym DNA. Informacje na ten temat uzyskiwano na podstawie obniżania się natężeń prądów pików oraz przesuwania potencjałów pików ich utleniania lub redukcji (laktofen) w obecności DNA. Badania wykazały możliwość tworzenia kompleksów analit-DNA, pozwoliły na określenie rodzaju oddziaływań (interkalacyjne lub elektrostatyczne), na wyznaczenie stałych wiązania, współczynników dyfuzji i heterogenicznych stałych szybkości reakcji wymiany elektronu. Doktorantka stwierdziła, że obecność kwasów nukleinowych spowalnia procesy wymiany elektronu przez badane substancje. Badania wykazały, że oddziaływanie dwuniciowego DNA z laktofenem może być zastosowane do oznaczania kwasów nukleinowych w zakresie niskich stężeń (1.0 – 10.0 ppm).

W podsumowaniu autoreferatu Doktorantka streściła dokonania naukowe opisane w czterech publikacjach i wykazała, że postawione cele zostały zrealizowane.

Autoreferat kończy spis odnośników literaturowych zawierający 44 pozycje, w tym cztery publikacje stanowiące recenzowany dorobek naukowy Doktorantki oraz streszczenie w języku angielskim.

W uzupełniającej części rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamila Morawska przedstawiła swój życiorys, przebieg dotychczasowej pracy i osiągnięcia naukowe z uwzględnieniem sumarycznego zestawienia danych bibliometrycznych. Przedstawiłem je we wstępnej części recenzji. Bardzo pomocne recenzentowi jest załączenie tekstów publikacji stanowiących podstawę Dysertacji Doktorskiej, pozwalające w szybki sposób zweryfikować dane zamieszczone w autoreferacie. Pracę kończą oświadczenia współautorów publikacji o udziale w ich powstaniu.

W mojej ocenie struktura pracy, podział treści są poprawne, logiczne i nie budzą zastrzeżeń. Analiza tekstu rozprawy, a przede wszystkim publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe Doktorantki pozwala stwierdzić, że sformułowane cele naukowe zostały w pełni osiągnięte i wnoszą wiele nowych i cennych elementów do rozwoju współczesnej elektroanalizy chemicznej. Opracowane procedury analityczne mogą mieć praktyczne zastosowanie do oznaczania sezamolu, laktofenu i metoksyfenozydu oraz DNA w próbkach rzeczywistych, a oddziaływania laktofenu, metoksyfenozydu i lamotryginy z DNA do wyjaśniania mechanizmu toksycznego i terapeutycznego leków i innych substancji biochemicznie czynnych z układami biologicznymi.

Obowiązkiem recenzenta jest zwrócić uwagę na najistotniejsze niedociągnięcia dostrzeżone podczas lektury rozprawy doktorskiej. Jest to zadanie trudne, ponieważ sprowadza się w istocie do ponownego recenzowania opublikowanych w recenzowanych czasopismach prac. Uwagi krytyczne nie dotyczą spraw merytorycznych lecz są podyktowane chęcią uzyskania dodatkowych informacji uzupełniających lub korygujących prezentowane w autoreferacie treści. Na najistotniejsze uwagi oczekuję odpowiedzi podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

- Str. 11. Doktorantka stwierdza, że „*pierwszy cel pracy można zdefiniować jako opracowanie elektrochemicznych metod oznaczania wybranych związków chemicznych...*”. Według mnie opracowane metody należą do węższej grupy metod elektrochemicznych określanych jako woltamperometryczne.
- Str. 12. Na Rys. 1 Doktorantka nie przedstawiła sesamolu, lamotryginy i pozostałych badanych substancji lecz ich wzory strukturalne.
- Str. 15. Charakteryzując układ pomiarowy Doktorantka stwierdza, że nasycona elektroda chlorosrebrowa Ag/AgCl/ (3 mol L⁻¹ KCl) stanowiła elektrodę odniesienia. Tego typu sformułowania są również używane w publikacjach. Według mnie podane stężenie KCl nie może dotyczyć roztworu nasyconego. Proszę również o wyjaśnienie, czym oprócz producenta różnią się elektrody ze szklatego węgla oznaczone jako GCE₁ i GCE₂.
- Str. 20. Z danych dotyczących walidacji opracowanych metod analitycznych zawartych w Tabeli 3 wynika, że wszystkie obliczone granice oznaczalności są poza zakresem liniowości. Proszę o komentarz.
- Str. 21. Omawiając analityczne zastosowanie opracowanych procedur Doktorantka nie wyjaśniła sposobu ekstrakcji sesamolu. W autoreferacie nie znalazłem informacji, czy w przypadku innych niż sesamol analitów stosowano metody odniesienia. Proszę też o wyjaśnienie, dlaczego w przypadku oznaczania metoksyfenozydu jako matrycę zastosowano wodę z rzeki Ljubljanica (Słowenia), a do prób oznaczania laktofenu wystarczyła woda z polskiej rzeki Mszanka.
- Str. 23. Opisując selektywność opracowanych procedur Doktorantka podała informacje na temat wpływu różnych interferentów na wyniki oznaczania laktofenu i metoksyfenozydu. Czy tego typu badania były również prowadzone w przypadku sesamolu?
- Str. 24. W części dotyczącej opisu procesów elektrodowych z udziałem analitów nie znalazłem dowodów potwierdzających nieodwracalność procesu (Tabela 5) oraz informacji na temat trwałości tworzących się produktów i ewentualnego udziału następczych reakcji chemicznych. Czy brak pików powrotnego na krzywych CV jest jednoznacznym dowodem nieodwracalności procesu elektrodowego? Dlaczego nie scharakteryzowano w ten sposób procesu redukcji laktofenu na Hg(Ag)FE (brak danych w Tabeli 5)? Czy Doktorantka stosowała kryteria diagnostyczne wywodzące się z techniki woltamperometrii cyklicznej? Czy podejmowano próby określenia liczby wymienianych elektronów? Ten fragment pracy jest według mnie odpowiedni do omówienia stałych szybkości reakcji wymiany elektronu podanych w Tabeli 6.
- Str. 26. Dlaczego jedynie w przypadku lamotryginy badano interakcje z jednoniciowym DNA (ssDNA). Czy w przypadku pozostałych analitów też to jest możliwe? Proszę też o wyjaśnienie,

dlaczego nie wyznaczono współczynników dyfuzji dla laktofenu i jego połączenia z dsDNA (Tabela 6), stałej wiązania i energii swobodnej Gibbsa (Tabela 7) oraz dlaczego nie określono liczby koordynacyjnej dla połączenia metoksyfenozyd-DNA (str. 30).

Pomimo wymienionych uwag do tekstu recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili Morawskiej oceniam ją bardzo wysoko. Swoją ocenę opieram przede wszystkim na jakości wyników przedstawionych w publikacjach oraz ich przydatności do rozwiązywania problemów analitycznych i biochemicznych.

Podsumowanie

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kamili Morawskiej spełnia wymagania zawarte w artykule 187 ustęp 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478). Stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Kamili Morawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę znaczny dorobek naukowy Doktorantki zawierający istotne elementy nowości naukowej i aspekt praktycznego zastosowania, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Kamili Morawskiej stosowną nagrodą.



Sławomir Michalkiewicz