

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: mgr Michał Adamski

Tytuł rozprawy doktorskiej: Warunki dekompozycji sinicowej cytotoksyny cylindropermopsyny.

Charakterystyka produktów jej rozkładu

Promotor: Prof. dr hab. Jan Białczyk

Promotor pomocniczy : dr Beata Bober

Recenzent: Prof. dr hab. Waldemar Karcz

1. Wartość naukowa rozprawy

Rozprawa doktorska mgr. Michała Adamskiego dotyczy fizykochemicznych warunków rozkładu cylindropermopsyny, jednej z najsilniej działających toksyn sinicowych, oraz charakterystyki produktów tego procesu. Chociaż podobne badania były prowadzone już wcześniej przez innych badacz (np. Chiswell et al. 1999) to wyniki prezentowane w recenzowanej rozprawie dostarczają nowych informacji o warunkach rozkładu cząsteczki cylindropermopsyny oraz produktów tworzących się podczas tego procesu. Oprócz fizykochemicznych badań nad CYN i produktami jej rozpadu Autor rozprawy sprawdza również ich aktywność w różnych testach biologicznych, oceniając równocześnie niebezpieczeństwo jakie związki te mogą stwarzać w naturalnych zbiornikach wodnych. Należy również w tym miejscu podkreślić fakt, że przeprowadzone badania są bardzo aktualne biorąc szczególnie pod uwagę problem związany z toksycznymi zakwitami sinic w akwenach wodnych wykorzystywanych przez człowieka w celach gospodarczych i rekreacyjnych.

Rozprawa doktorska mgr. Michała Adamskiego została podzielona na dziesięć rozdziałów, typowych jak w przypadku prac eksperymentalnych, z których połowa zawiera również podrozdziały. Wstęp został poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem słów kluczowych i wykazem stosowanych skrótów. We Wstępie Autor rozprawy przedstawia szereg zagadnień dotyczących toksyn produkowanych przez sinice. Szczególną uwagę zwraca na efekty jakie powodują one w organizmach kręgowców, skąd, jak pisze Autor, wynika również ich podział na cztery grupy takie jak: hepatoksyny, neurotoksyny, dermatoksyny i cytotoksyny. Ponadto charakteryzuje cylindropermopsynę, opisując jej właściwości fizykochemiczne, obecność w środowisku naturalnym, biosyntezę i aktywność biologiczną. Rozdział ten kończy opisem metod oznaczania cylindropermopsyny. Wstęp został napisany przez Autora jasno i klarownie w oparciu o bieżącą i historyczną już literaturę (np. Francis 1878). Kolejny rozdział to Cel pracy którym było: 1- poszerzenie wiedzy o procesie dekompozycji CYN zachodzącym pod wpływem wybranych czynników abiotycznych (temperatura, pH roztworu i promieniowanie UV-B) oraz charakterystyka powstających produktów podczas jej rozpadu, 2- określenie stopnia toksyczności (w oparciu o wybrane testy) produktów rozkładu CYN w porównaniu do oddziaływania czystej toksyny, i 3- oszacowanie wpływu CYN lub produktów jej dekompozycji na zdolności antyoksydacyjne glutationu oraz na obniżenie jej toksyczności po chelatacji z jonami żelaza(III). Rozdział Materiał i Metody zawiera całą gamę metod i testów biologicznych pozwalających oszacować rozkład CYN i scharakteryzować produkty tego procesu w różnych warunkach fizykochemicznych. Rozdział ten mgr M. Adamski rozpoczyna od opisu warunków kultury sinic *Cylindropermopsis raciborskii*, szczep CS 505/7, pozyskanych z Australian Algae Culture Collection. Następnie Autor przechodzi do opisu analizy i oczyszczania cylindropermopsyny z wykorzystaniem metody HPLC. Analizę jakościową związków pochodzenia sinicowego przeprowadza z wykorzystaniem techniki ultrasprawnej chromatografii cieczowej z

tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS). Metoda ta umożliwia również opisanie struktury chemicznej i ścieżki fragmentacyjnej produktów dekompozycji CYN. Autor rozprawy opisuje również szczegółowo eksperymenty w których bada wpływ pH, temperatury i promieniowania UV-B na stabilność cząsteczki CYN. I ostatnia ważna część rozdziału Materiał i Metody to opis testów biologicznych pozwalających określić toksyczność produktów dekompozycji cylindrospermopsyny. Należy tutaj wymienić testy: Thamnofoxkit FTM, Deltatox II, aktywności kolagenazy i aktywności elastazy. Ponadto opisuje również metody służące oszacowaniu wpływu CYN lub produktów jej dekompozycji na proliferację i żywotność ludzkich komórek naskórka i na aktywność migracyjną komórek ludzkiego nabłonka. Materiał i Metody zostały opisane jasno i klarownie nie budząc wątpliwości dla osoby która chciałaby przeprowadzić podobne badania. Opis stosowanych metod i testów to dobra „instrukcja” dla zastosowanych metod badawczych.

Rozdział Wyniki to najobszerniejsza część rozprawy doktorskiej mgr. Michała Adamskiego, której objętość wynosząca 44 strony stanowi prawie 1/3 rozprawy (142 strony). Uzyskane wyniki to rezultat umiejętnie zaplanowanych badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych pozwalających m. in. określić masy molowe oraz jony fragmentacyjne produktów rozpadu CYN, co z kolei umożliwia zaproponowanie ich struktur chemicznych oraz określenie potencjalnych ścieżek fragmentacyjnych. Zastosowane testy pozwoliły natomiast oszacować aktywność biologiczną CYN i produktów jej dekompozycji. Ostatnia część wyników dotyczy oszacowania wpływu CYN oraz produktów jej dekompozycji na zdolności antyoksydacyjne glutationu oraz na obniżenie jej toksyczności po chelatacji z jonami żelaza(III).

Za najbardziej wartościowe i interesujące wyniki opisane w rozprawie doktorskiej mgr. Michała Adamskiego uważam stwierdzenie, że:

- w warunkach kwasowych i obojętnych (pH 3-7) cylindrospermopsyna (CYN) zachowuje stabilność przez wiele tygodni, natomiast w środowisku o pH 10 i 12 ulega rozkładowi, przy czym proces ten jest znacznie przyspieszany w temperaturze 100 °C,
- promieniowanie UV-B w roztworach o pH zasadowym przyczynia się po 24 godzinach do całkowitego rozkładu CYN i wytworzenia sześciu jej produktów dekompozycji,
- całkowita dekompozycja CYN zachodząca w roztworach zasadowych w temperaturze wrzenia lub w obecności promieniowania UV-B prowadzi do wytworzenia produktów o masach od 292.1 do 336.1 Da i od 214.2 do 414.1 Da, odpowiednio,
- CYN jak i produkty jej dekompozycji z dużą efektywnością hamują aktywność kolagenazy i elastazy oraz wyraźnie obniżają aktywności proliferacyjne i zdolności regeneracyjne ludzkich keratynocytów,
- chelatowanie CYN lub produktów jej dekompozycji z jonami żelaza(III) nie powoduje zmiany ich biologicznej aktywności.

Zamieszczone wyniki Autor rozprawy prezentuje na 49 rysunkach i w 9 tabelach. Prezentacja danych nie budzi zastrzeżeń. Analiza statystyczna danych jest odpowiednia.

Dyskusja wyników jest przeprowadzona w sposób przemyślany w oparciu o bieżącą literaturę dotyczącą problematyki przeprowadzonych badań. Autor unika przytaczania w Dyskusji danych eksperymentalnych co czyni ją bardziej klarowną. Wyniki własne nie tylko porównuje z wynikami innych badaczy ale wysuwa także własne oryginalne hipotezy.

Rozdział X to Literatura składająca się ze 154 pozycji wśród których można znaleźć prace historyczne jak i prace z 2018 roku.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr. Michała Adamskiego oceniam bardzo wysoko biorąc w szczególności pod uwagę uzyskanie nowych informacji dotyczących warunków dekompozycji CYN i produktów tego procesu w zależności od czynników abiotycznych takich jak temperatura, pH roztworu i promieniowanie UV-B. Na tą wysoką wartość oceny ma także wpływ uzyskanie przez Autora oryginalnych wyników dotyczących przeprowadzonych testów biologicznych, których celem było oszacowanie toksyczności CYN i produktów rozkładu tej cząsteczki. Zastosowanie zaawansowanych metod badawczych jak również użycie odpowiednich narzędzi statystycznych uzasadnia dodatkowo

wartość uzyskanych wyników. Autor rozprawy umiejętnie wprowadza czytelnika w tematykę badawczą rozprawy, jasno precyzuje cele badawcze, sprawiając, że rozprawę czyta się z dużym zainteresowaniem. Sposób prowadzenia Dyskusji, w której Autor nie tylko porównuje otrzymane wyniki własne z wynikami innych badaczy, ale wysuwa także własne hipotezy, co podnosi z jednej strony wartość pracy z drugiej zaś podkreśla dojrzałość naukową mgr. M. Adamskiego. Na merytoryczną ocenę rozprawy ma także wpływ aktualność przeprowadzonych badań o czym świadczy narastający problem zakwitu sinic w akwenach wodnych. W Podsumowaniu Autor rozprawy przedstawia w punktach wyniki badań z których dwa ostatnie mają charakter wniosków.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Układ rozprawy nie budzą zastrzeżeń. Rozprawa zawiera typowe rozdziały proponowane dla prac eksperymentalnych. Ich kolejność jest poprawna. Została napisana ładną i poprawną polszczyzną. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim. Użyta kolorystyka rysunków i tabel znacznie wzbogaca szatę graficzną rozprawy.

4. Uwagi krytyczne

Moje uwagi krytyczne mają charakter redakcyjny i dotyczą:

- poprawności sformułowania „napromieniowanie zakresem UV-B” – poprawnie jest „napromieniowanie UV-B”, poddane działaniu UV-B lub poddane działaniu promieniowania UV z zakresu UV-B.
- nadtlenek wodoru nie jest wolnym rodnikiem (str. 120).

5. Ocena końcowa

Biorąc pod uwagę stwierdzenia, które zawarłem w punktach 1, 2 i 3, takie jak: dostarczenie nowych informacji o warunkach rozkładu cząsteczki cylindrospermopsyny oraz produktów tworzących się podczas tego procesu, oryginalność wyników otrzymanych w testach biologicznych, aktualność przeprowadzonych badań, zastosowanie zaawansowanych metod badawczych jak również użycie odpowiednich narzędzi statystycznych, otrzymanie ważnych dla nauki wyników, wnikliwa dyskusja i sformułowanie własnych hipotez, rozprawę doktorską mgr. Michała Adamskiego oceniam bardzo wysoko.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr. Michała Adamskiego** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr. Michała Adamskiego** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Michała Adamskiego biorąc w szczególności pod uwagę ważność i ilość przeprowadzonych badań, ich aktualność i perfekcyjne przygotowanie rozprawy.

21.08.2018

.....
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta