



**UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA**

**Wydział Chemii**

**Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki**

**ul. Gagarina 7., 87 100 TORUŃ**



Tel.: (+48) (56) 61 14 308 • Tel/fax: (+48) (56) 61 14 837 • e-mail: [bbusz@chem.umk.pl](mailto:bbusz@chem.umk.pl)

**Kierownik Katedry:** *prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h.c. mult.*

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Persona  
pt. „Wpływ benzylopiperazyny – modelowego związku z grupy dopalaczy  
na stan energetyczny komórek, apoptozę i stres oksydacyjny” wykonanej  
w Zespole Analiz Toksykologicznych i Farmaceutycznych  
Zakładu Chemii Analitycznej Wydziału Chemii oraz Zakładu Biochemii  
Klinicznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Wojciecha Piekoszowskiego  
i prof. dr hab. med. Aldony Dembińskiej-Kieć.

Substancje psychotropowe, jak zauważa Autorka opiniowanej rozprawy, są znane społeczności od tysięcy lat. Stosowane były przez różnego rodzaju cyrulików nie tylko jako leki. Wspomagały, i niestety nadal wspomagają doznania emocjonalne, zmiany w koncentracji, pamięci czy poprawę wydolności intelektualnej, artystycznej czy fizycznej osób, które je stosują. Tego typu substancje biologicznie aktywne, są prawnie zabronione, dlatego stanowią przedmiot/obiekt szeroko rozwiniętego obrotu czarnorynkowego. Postęp cywilizacyjny oraz poprawa warunków życia powoduje, że rynek ten systematycznie uzupełniany jest w nowe specyfiki tzw. „dopalacze”, nierzadko pochodne znanych preparatów, by ominąć obowiązujące przepisy w ich produkcji i dystrybucji. Szczególnie niebezpieczne jest to gdy odnosi się do ludzi młodych, często poszukujących wzmożonych doznań emocjonalnych, nie zdających sobie często sprawy z konsekwencji stosowania tych używek. Wśród całej gamy związków psychotropowych znane są preparaty naturalne (wyciągi lub ekstrakty roślinne czy grzyby) oraz używki zsyntetyzowane w laboratoriach, często stanowiące modyfikację lub „kopię” właśnie tego co natura wyprodukowała. Pomysłowość chemików-syntetyków jest tak duża, że konieczne jest ciągle opracowanie nowych, bardziej skutecznych metodyk i procedur umożliwiających kontrolowanie, monitoring i wykrywanie substancji powodujących zaburzenia psychofizyczne.

Ładnie i przekonująco opisane to zostało we wstępie ocenianej dysertacji. Słusznie Doktorantka zauważyła, że nie wystarczy mieć „dobre”

przepisy i regulacje prawne, konieczne jest skutecznie i umiejętnie z nich korzystać i konsekwentnie realizować. Stąd pomimo różnic w przepisach prawnych, co do stosowania i obrotu preparatami psychotropowymi w krajach Unii Europejskiej i nie tylko, konieczne jest globalne podejście do tego ważkiego zagadnienia.

Żeby móc skutecznie włączyć się w realizację tych działań, konieczne jest kompleksowe i wielokierunkowe podejście. Jednym z istotnych czynników, obok aspektów prawnych, są zagadnienia metabolizmu tych związków w organizmach żywych oraz skutki toksyczności. Poznanie więc mechanizmów przebiegających na poziomie molekularnym jest zagadnieniem ważnym, aktualnym i obdarzonym dużym ładunkiem tzw. nowości naukowej. Dlatego nie dziwi recenzenta, że Autorka niniejszej dysertacji wraz z Promotorami, w opisanych badaniach skupiła się na wyjaśnieniu wpływu modelowego specyfiku z grupy „dopalaczy”, jakim jest 1-benzylpiperazyna, na procesy biologiczne wybranych typów komórek ludzkich.

Tematyka, realizacji której podjęła się Doktorantka należy do trudnych z punktu widzenia opanowania warsztatu badawczego jak i wiedzy ogólnej. Charakteryzuje ją interdyscyplinarne podejście do rozwiązywanych problemów. Tego typu badania stanowią najwyższy stopień umiejętności łączenia osiągnięć teoretycznych z praktyką. Nie dziwi więc fakt, że problematyka ta znalazła uznanie w oczach ekspertów NCN w postaci przyznania subwencji finansowej na realizację tych badań (projekt Etiuda II).

Wywiązując się z obowiązku recenzenta konieczne jest w pierwszym rzędzie udzielenie odpowiedzi na standardowe pytanie; czy opisana problematyka jest nowatorska i aktualna? Odpowiedź na tą kwestię po części już została udzielona, ale to nie wszystko. Czytelnik bowiem znajdzie jej rozwinięcie w poszczególnych rozdziałach niniejszej rozprawy. Stanowi ona klasyczny układ, składający się z części teoretycznej, celu badań, jak też części **eksperymentalnej**, w której czytelnik znajdzie: materiały i opis warunków eksperymentów, odczynniki, aparaturę oraz metodykę badań. Osobne rozdziały poświęcone są opisom wyników badań oraz ich **omówieniu i dyskusji**. Całość spinają **wnioski, spis literatury, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis rysunków i tabel**. Konieczne należy wspomnieć o niezwykle użytecznym **spisie skrótów i akronimów** stosowanych w rozprawie, który znajduje się na początku dysertacji. Całość liczy 183 strony maszynopisu, stosunkowo bogato dokumentowanego rysunkami (37) i tabelami (6) oraz 286 pozycjami cytatów literaturowych. Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń do układu niniejszego opracowania. Jest on typowy. Jednakże w tym miejscu muszę skomentować spis literatury, charakterystyczny dla prac medycznych, a nie nauk ścisłych. Utrudnia to

śledzenie cytowanych prac i niejednokrotnie wprowadza zamieszanie w ich przypisaniu do cytowanych faktów. Z wielką satysfakcją muszę stwierdzić, że praca jest bardzo estetyczna. Napisana jest dobrym, polskim językiem, co w ostatnim czasie zdarza się rzadko. Nie znalazłem w niej ani jednego błędu (!!!). Widać starannie wykonaną korektę. To się chwali. Rysunki i tabele są czytelne, przejrzyste. Nie ma w nich przerostu formy nad treścią. W pracy znaleźć można również odnośniki do aktualnych ustaw (4) oraz 9 raportów europejskich.

Analizując treść *części teoretycznej* czytelnik znajdzie tam fizykochemiczną i toksykologiczną charakterystykę benzylopiperazyny, jej metabolizm oraz farmakokinetykę. Następnie Autorka w swoich rozważaniach odniosła się też do apoptozy jako zespołu czynników odpowiedzialnych za cytotoksyczność. To dobrze opisana część stanowiąca dobre wprowadzenie do rozważań przedstawionych przy interpretacji uzyskanych wyników. Rozdział ten po uzupełnieniu mógłby stanowić dobry materiał edukacyjny dla młodszych adeptów nauki.

W *części eksperymentalnej* Doktorantka precyzyjnie opisała metodyki i warunki przeprowadzonych operacji oraz zastosowane techniki pomiarowe jak również zamieściła wykaz odczynników i materiałów zastosowanych w badaniach. Podkreślić trzeba trafność zarówno wyboru użytych technik jak i przyrządów oraz oprogramowania dzięki którym, według mojej opinii, wytyczony przez Promotorów i Doktorantkę *cel został w pełni osiągnięty*. Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki należy uznać:

1. zastosowanie do oceny wpływu 1-benzylopiperazyny jako modelowego „dopalacza” na nasilenie stresu oksydacyjnego i energetycznego oraz apoptazę w wybranych typach komórek ludzkich w eksperymentach realizowanych w układzie *in vitro*,
2. określenie przemian metabolicznych 1-benzylopiperazyny na poziomie komórkowym ze szczególnym uwzględnieniem przemian wpływu tego ksenobiotyku na funkcje mitochondriów, a zwłaszcza zmian potencjału błony mitochondrialnej oraz biosyntezę ATP,
3. oszacowanie i wykazanie wpływu 1-benzylopiperazyny na zmiany generacji reaktywnych form tlenu w komórkach będących efektem zaburzeń funkcji mitochondriów oraz uszkodzeń oksydacyjnych struktur DNA,
4. opis i wyjaśnienie wpływu 1-benzylopiperazyny na proces apoptozy poprzez analizowanie szlaków indukcji programowanej śmierci komórek poprzez ocenę aktywacji kaspazy-8 związanej ze szlakiem receptorowym oraz kaspazy-9 związanej z uszkodzeniem mitochondriów,
5. określenie ekspresji genów związanych z procesem apoptozy pod wpływem działania modelowego ksenobiotyku (1-benzylopiperazyna) za pomocą techniki Real Time PCR.

Jak w każdej recenzowanej pracy, zwłaszcza dobrej i nowatorskiej, doszukać się można różnych niejasności i uchybień. Zadaniem recenzenta jest wyłowić je, poddać krytycznej ocenie i dyskusji. Podkreślając dokonania i osiągnięcia Doktorantki oraz jej benedyktyńską wytrwałość w konsekwentnym realizowaniu wytyczonych założeń muszę stwierdzić, że dziwnie brzmi sformułowanie o „rekreacyjnym lub okazjonalnym użytkowaniu ...” (str. 40) czy tzw. „wodzie wolnej od...” (str. 104). Innym trochę dziwnym określeniem jest „przeciek elektronów” (str. 143). A tak *à propos* jaki jest więc mechanizm i wpływ przejścia singletowego tlenu w omawianym układzie? Inną wątpliwością i niejasnością dla recenzenta jest sposób określenia potencjału błony mitochondrialnej poprzez jego bezpośredni pomiar(?), oraz wykorzystanie np. QSRR do określenia farmakokinetyki przejścia ksenobiotyku przez barierę biologiczną (granica faz). Pewien niedosyt mam też z powodu braku informacji na temat opublikowanych przez Doktorantkę publikacji. Dałoby to pogląd weryfikacji uzyskanych przez Nią wyników z osiągnięciami światowych specjalistów.

Reasumując, powyższe uwagi nie mają wpływu na merytoryczną wartość pracy, większość z nich ma charakter dyskusyjny. Spodziewam się, że uzyskam na nie odpowiedź podczas publicznej obrony. Jednocześnie uważam, że w świetle obowiązujących przepisów (Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z uzupełnieniami*) przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i **wnoszę** do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o **dopuszczenie mgr Karoliny Persona** do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych.

Praca swoją tematyką, zakresem (interdyscyplinarny charakter), nowatorstwem i jakością zdecydowanie wykracza poza ogólnie przyjęte standardy. Biorąc pod uwagę wymagania stawiane tego typu pracom z pełnym przekonaniem **wnoszę** do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie *o jej wyróżnienie*.

Stary Toruń, 23 kwiecień 2015 r.



Prof. dr. hab. Bogusław BUSZEWSKI  
prof. zw. UMK