



KATEDRA  
BIOFIZYKI

Lublin, 10 luty 2020 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS  
Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Dzmitryi Ushakou pt. „The spectral and kinetic properties of molecular systems with ESIPT in studies of charge transfer reversibility, complex formation and polymerization processes”**

Trudno dziś przecenić rolę, jaką odegrały techniki fluorescencyjne w rozwoju badań w obszarze fizyki molekularnej i biofizyki. Niejako standardem stały się pomiary intensywności luminescencji, procesów jej gaszenia, czasu zaniku fluorescencji, wielkości efektu solwatochromowego, anizotropii oraz zaniku anizotropii luminescencji, czy też zjawiska bezpromienistego (fösterowskiego) transferu energii. Nowa era badań dotycząca tej tematyki przynależy na pewno do detekcji sygnałów prowadzonej na poziomie pojedynczych cząsteczek oraz analiz obrazów mikroskopowych z rozdzielczością znacznie przekraczającą 100 nm, a więc zdecydowanie poniżej wielkości wyznaczonej połową długości fali promieniowania stosowanego do obrazowania obiektów. Postęp we wspomnianych zagadnieniach nie byłby jednak możliwy bez pełnego zrozumienia zjawisk fotofizycznych. Za szczególnie interesujące, Pan mgr Dzmitryi Ushakou uznał wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym (*ang.* Excited State Intramolecular Proton Transfer, ESIPT) prowadzące do powstania dwóch form tej samej cząsteczki: podstawowej i tautomerycznej. Cykl badań wykonanych oraz zaprezentowanych przez

Doktoranta w ramach Jego rozprawy doktorskiej dotyczył m. in. opisu teoretycznego tego zjawiska w aspekcie określenia tzw. czynnika odwracalności procesu ESIPT oraz doświadczalnego wyznaczenia tej wartości dla cząsteczek 3-hydroksyflawonu (3-HF) oraz 4'-N,N-dimetyloamino-3-hydroksyflawonu (DMA3HF). Wobec faktu, iż cząsteczki te posiadają znaczny potencjał technologiczny jako sondy fluorescencyjne, przedłożona praca jest opracowaniem nie tylko interesującym, ale również ważnym. W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć badawczych jest wysoka, zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Praca została wykonana w Zakładzie Fizyki Instytutu Nauk Ścisłych i Technicznych Akademii Pomorskiej w Słupsku, pod kierunkiem prof. dr. hab. Vladimira Tomina, uznanego specjalisty w obszarze spektroskopii molekularnej.

Rozprawę doktorską stanowi znakomicie napisane opracowanie, które oparto na pięciu oryginalnych, dwuautorskich artykułach, opublikowanych w indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w których (sądząc po oświadczeniu Autora, zamieszczonym na końcu rozprawy) udział Doktoranta można uznać za istotny. Prace charakteryzują się dużymi wartościami oddziaływania tzw. impact factor (*Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (IF 2.931), w której Doktorant jest pierwszym w kolejności autorem, dwie prace w *Journal of Luminescence* (IF 2.693), jedną w *Polymer Testing* (IF 2.943) oraz *Journal of Applied Spectroscopy* (IF 0.675), w których jest On drugim w kolejności. W ogólności, Doktorant jest autorem 9 publikacji naukowych powstałych w latach 2011-2019.

Praca doktorska została zredagowana w języku angielskim na 136 stronach maszynopisu, podzielonego na pięć rozdziałów, poprzedzonych spisem treści oraz wykazem użytych skrótów i oznaczeń. Rozprawę rozpoczyna *Streszczenie* (przygotowane zgodnie z wymogami formalnymi w języku polskim i angielskim), które pozwala na zapoznanie się z tematyką badawczą podjętą przez Doktoranta. Co ciekawe, Autor nie zdecydował się na wyodrębnienie osobnego podrozdziału zawierającego cel badań, ale nakreśla go osobno dla każdego rozdziału w części *Streszczenie* lub częściowo we wstępie do każdego z podrozdziałów. Oprócz wspomnianego, w części opisowej każdego *Introduction*, w sposób zwięzły i klarowny mgr Ushakou wprowadza

w aktualny stan wiedzy i otwarte problemy badawcze dotyczące rozważanego zjawiska fizycznego. Rozdział 1 zawiera analizę teoretyczną kinetyki procesu ESIPT, opartą na uproszczonym modelu czterech stanów elektronowych (po dwa, dla cząsteczki w formie podstawowej i tautomerycznej). Teoria zjawiska wprowadzana jest w sposób systematyczny poprzez przejrzyste i przemyślane grafiki. Doktorant rozważa tu model przyjęty za Kashą z roku 1986. Określa w nim notację stałych szybkości, liczbę obsadzeń poziomów elektronowych oraz tzw. czynnik odwracalności cząsteczki z formy tautomerycznej do podstawowej. W rozdziale tym, wyjaśnia również pochodzenie charakterystycznego, dwupasmowego widma emisji. Choć informacje nie są nowe, same w sobie bardzo ciekawe i traktowane jako wstęp do właściwego problemu. Autor wyraża przekonanie, że ESIPT może służyć jako model do zrozumienia kolejnych kroków „ciemnych” reakcji przenoszenia protonów, które są udziałem wielu zjawisk chemicznych i biochemicznych.

W rozdziale drugim Doktorant opisuje strukturę chemiczną 3-HF i DMA3HF oraz obecny stan wiedzy na temat cząsteczek w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako sond fluorescencyjnych. W oparciu o publikację Lazzaroni i wsp. (zamieszczoną w bibliografii pod numerem 13) odnosi się do wydajności procesu ESIPT w funkcji polarności użytego rozpuszczalnika. Wyprowadza też analogiczną (nieco zmodyfikowaną dla wyznaczanych parametrów optycznych) postać zależności Arrheniusa, którą wykorzystuje dalej do wyznaczenia wartości energii aktywacji pomiędzy poziomami energetycznymi wspomnianych cząsteczek w ich formach podstawowej i tautomerycznej. W tym celu, przeprowadza eksperymenty zależności intensywności emisji fluorescencji pochodnych flawonu od temperatury, używając dwóch rozpuszczalników: acetonitrylu i octanu etylu. W uzasadnionych przypadkach przekrywania się pasm emisji stosuje analizę dekompozycji widm. Dbałość mgr. Ushakou o dokładne dopasowanie danych doświadczalnych wybraną funkcją asymetryczną skutkuje prostoliniowym uszeregowaniem punktów na wykresie Arrheniusa, a tym samym, dokładnym wyznaczeniem energii aktywacji. Uzyskane wyniki komentowane są dalej w kontekście odwracalności procesu ESIPT. Mgr Ushakou dowodzi, że dwa rzędy wielkości różnicy pomiędzy wyznaczonymi energiami aktywacji uprawdopodobniają bardziej odwracalność ESIPT dla cząsteczki DMA3HF niż 3-HF.

W rozdziale trzecim mgr Ushakou rozważa odwracalność procesu ESIPT w kontekście spektroskopii czasowo-rozdzielczej. Dokonuje opisu kinetycznego reakcji ESIPT na podstawie analizy teoretycznej zawierającej sześć stałych szybkości możliwych reakcji w stanie wzbudzonym. Zauważa, że granica stosunku intensywności pochodzącej od form podstawowej i tautomerycznej (przy  $t \rightarrow \infty$ ) będzie dążyć do zera w przypadku procesów nieodwracalnych transferu protonu lub charakteryzować się wartością niezerową w przypadku procesów odwracalnych. Nakreśla On dalej teoretyczne przebiegi spodziewanych zaników intensywności emisji procesów odwracalnych i nieodwracalnych wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu i zestawia je w kolejnym podrozdziale z danymi doświadczalnymi uzyskanymi przy użyciu kamery smugowej dla 3-HF oraz DMA3HF. Dla pierwszej z nich, Autor obserwuje zmiany rozkładu intensywności fluorescencji pasm zlokalizowanych przy 410 nm i 530 nm, a przy użyciu rozkładu dwu-eksponencjalnego dopasowuje zaniki intensywności fluorescencji form podstawowej i tautomerycznej. Analogiczne badania przeprowadza dla DMA3HF dla pasm zlokalizowanych przy 480 nm i 575 nm, przypisanych odpowiednio formie podstawowej i tautomerycznej cząsteczki. Poprzez analizę wartości dla uzyskanych wyników mgr Ushakou dowodzi słuszności swoich rozważań teoretycznych i ponownie potwierdza własności badanych cząsteczek dotyczące odwracalności zachodzącego w nich procesu ESIPT.

Kolejny rozdział poświęcony został badaniom nad kompleksowaniem jonów metali z cząsteczkami, dla których zachodzi ESIPT. Spodziewano się, że wiązanie się cząsteczki będącej w stanie podstawowym z jonem metalu, będzie w następstwie blokowało przekaz protonu. Doktorant wyprowadził równanie na stosunek intensywności pochodzącej od sumy intensywności form cząsteczki w stanie podstawowym oraz związanej z jonem metalu, odniesionej do intensywności emisji formy tautomerycznej. Rozważał przypadki postaci tego stosunku dla odwracalnego i nieodwracalnego procesu ESIPT. Przeprowadził obliczenia kwantowo-mechaniczne przy użyciu programu Gaussian 09, które umożliwiły mu znalezienie formy wiązania się metalu z 3-HF. Mgr Ushakou z dobrym skutkiem konfrontował również położenie wyliczonych wartości energii dla stanów elektronowych, z doświadczalnymi widmami absorpcji, co dowodziło o poprawności doboru metody obliczeniowej. W przypadku 3-HF, który charakteryzował się nieodwracalnością procesu przekazu protonu, Doktorant obserwował wzrost

intensywności krótkofalowego maksimum emisji w funkcji stężenia jonów litu, przy znikomej zmianie intensywności pasma długofalowego. Analiza czasowo-rozdzielcza zastosowana dla tych pasm, potwierdziła przewidywania teoretyczne załączone we wstępie. Zaobserwowano, że jeżeli czas życia stanu wzbudzonego charakteryzujący kompleks z metalem jest dłuższy niż formy tautomerycznej, to stosunek intensywności pasm krótko- i długofalowego rośnie wraz z czasem. Teoretycznie rozważano także przypadki i ich wpływ na stosunek kinetyczny, kiedy te czasy życia są porównywalne oraz kiedy czas życia fluorescencji dla formy tautomerycznej jest większy niż czas zarejestrowany dla kompleksu z metalem.

W rozdziale piątym mgr Ushakou podjął się zadania praktycznego zastosowania badanego przez siebie procesu ESIPT do kontroli fotoindukowanej polimeryzacji akrylanu. Zaproponowana metoda bazowała na pomiarze wydajności fluorescencji w czasie tego procesu. Należy docenić duży potencjał i wygodę eksperymentalną zaproponowanej metody, z uwagi na możliwość monitorowania różnorodnych procesów przy dużym przesunięciu Stokesowskim.

Integralną częścią pracy są tzw. appendix, dodatki w których Autor zawarł dokładny opis procedury przeprowadzonych eksperymentów, pozwalających na dokładne odtworzenie doświadczeń. Jak mogłem dowiedzieć się z rozdziału poświęconemu podziękowaniom, doświadczenia te były wykonane w innych niż macierzysty ośrodkach naukowych. Świadczy to o otwartości Doktoranta na zawieranie współpracy naukowych mających na celu realizację postawionych sobie celów badawczych.

Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorowi jedynie nieliczne poprawki:

1. Str. 13, drugi wiersz od góry, „they play” w miejsce „they plays”
2. Wyniki analiz doświadczalnych przedstawione na rys. 2.2.2, 2.2.6, 3.4.1 (wstawka), 4.2.2.5 oraz 5.2.4, pomimo widocznej tendencji, powinny być opatrzone wartościami odchyień od wartości średnich.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji o własnościach pochodnych flawonoli i wydajności procesu ESIPT w ich obrębie, ale jednocześnie nasuwają pewne pytania:

1. Zmiany konformacyjne cząsteczek w stanie wzbudzonym mogą wpływać na przesunięcie równowagi dla procesu ESIPT. Czy były one brane pod uwagę przez Autora przy rozpisywaniu kinetyki reakcji i czy uznaje je za zaniedbywalne dla rozważanych cząsteczek?
2. Jak można dowiedzieć się z lektury rozprawy, flawonole odgrywają dużą rolę jako fotoprotektory nici DNA przed szkodliwymi własnościami światła UV. Jakie własności predestynują te cząsteczki do wspomnianej roli, skoro w ich widmie absorpcji obserwowane jest minimum przy ok. 260 nm (które jednocześnie przypada na maksimum absorpcji DNA)?
3. Jak bardzo w opinii Doktoranta wiązania wodorowe tworzone z cząsteczkami rozpuszczalnika mogą wpływać na kinetykę obserwowanych reakcji odwracalności procesu ESIPT?
4. Widmo absorpcji 3-HF w obecności LiCl zaprezentowane na rys. 4.2.1.2 posiada niezerową absorbancję przy ok. 400 nm, w przeciwieństwie do widma tej samej cząsteczki bez dodatku jonów. Co według Autora może być źródłem wzrostu absorbancji w tym obszarze spektralnym? Czy obserwowanego efektu nie należałoby uwzględnić w zapisanej kinetyce procesów?

Podsumowując, chciałbym stwierdzić, iż pan mgr Dzmityri Ushakou przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaplanowanych oraz przeprowadzonych rozważań teoretycznych i eksperymentów. Badania te wymagały swobodnego poruszania się w ramach wielu podejść metodologicznych. Rozprawa doktorska opiera się na oryginalnych wynikach prac oraz analiz, ogłoszonych w pięciu artykułach, opublikowanych w renomowanych międzynarodowych czasopismach specjalistycznych, dowodząc dojrzałości naukowej Doktoranta. W mojej opinii oceniana rozprawa spełnia podstawowe wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich oraz warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca

2003 r. o stopniach naukowych i tytule oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Uprzejmie wnoszę o dopuszczenie mgr. Dzmitryi Ushakou do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.

Mając na uwadze wartość merytoryczną i naukową badań przeprowadzonych przez mgr. Ushakou, wnoszę również do Rady Dyscypliny Nauk Fizycznych Uniwersytetu Gdańskiego o rozważenie możliwości uznania przedmiotowej rozprawy doktorskiej za wyróżniającą.

Gratuluje Doktorantowi oraz Panu Promotorowi tak cennych rezultatów.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Prof. Dr. hab. in Physics". The signature is written in a cursive, flowing style.