



## POLITECHNIKA POZNAŃSKA

Wydział Fizyki Technicznej

tel.: 61 6653200, faks: 61 6653201, e-mail: [office\\_dtpf@put.poznan.pl](mailto:office_dtpf@put.poznan.pl)

Katedra Spektroskopii Optycznej

tel.: 61 6653164, faks: 61 6653164, e-mail: [office\\_cos@put.poznan.pl](mailto:office_cos@put.poznan.pl)



Dr hab. Tomasz Martyński, prof. nadzw.  
e-mail: [Tomasz.Martynski@put.poznan.pl](mailto:Tomasz.Martynski@put.poznan.pl)  
tel.: 61 6653172

Poznań, 2 października 2013 r.

### Recenzja

pracy doktorskiej mgr **Moniki Orlof** pod tytułem „Fizykochemiczne *badania pochodnych kaliksarenów do zastosowań biomedycznych*”, wykonanej pod kierunkiem profesor dr. hab. Marii Paluch i promotora pomocniczego dr Beaty Korchowicz w Zakładzie Chemii Fizycznej i Elektrochemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Synteza związków aktywnych biologicznie i badanie ich właściwości na poziomie molekularnym oraz oddziaływanie na żywe organizmy a zwłaszcza na organizm ludzki stanowi najważniejszy obszar prac badawczych, jakim zajmują się interdyscyplinarne zespoły badawcze na całym świecie. Szeroko pojęte zagadnienia zdrowia stanowią priorytet działań zarówno Unii Europejskiej jak i Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej. Zrozumiałe są wysokie nakłady finansowe i zaangażowanie dużych zespołów badawczych w tej dziedzinie.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska lokuje się w nurcie zagadnień związanych z projektowaniem i syntezą nowych leków. Niezaprzeczalnie, stosowanie prostych modeli pozwala na dogłębne poznanie mechanizmów rządzących oddziaływaniami molekularnymi pomiędzy fosfolipidami a cząsteczkami leków, co stanowi pierwszy podstawowy krok w stronę poznania mechanizmów zmian funkcjonowania natywnych błon biologicznych w kontakcie z lekami. Poprzez interdyscyplinarne badania eksperymentalne i teoretyczne uzyskuje się głęboki wgląd w złożony proces interakcji antybiotyków z fosfolipidami – podstawowym budulcem błon biologicznych i wpływem na jej strukturę.

Celem przedłożonej mi do recenzji pracy, który postawiła sobie Doktorantka, było określenie wpływu nowych pochodnych kaliksarenów wykazujących działania przeciwbakteryjne na właściwości fizykochemiczne i strukturę monowarstw molekularnych zbudowanych z

fosfolipidów wchodzących w skład błon biologicznych drobnoustrojów. Doktorantka wybrała do badań dwie cząsteczki *p-tert*-butylo-kaliks[4]arenu podstawione w dolnej części kielicha różnymi antybiotykami: *p-tert*-butylokaliks[4]aren-mono-propylonalidylsowy (KI) i *p-tert*-butylokaliks[4]aren-bis-propylonalidylsowy (KII) oraz dobrze rozpuszczalny w wodzie kaliks[4]aren z przyłączonymi do górnej części kielicha dodatkowo naładowanymi grupami guanidynowymi – trifluorooktan tetra-*p*-guanidynoetylokaliks[4]aren (CX) i jego monomer trifluorooktan-*p*-guanidynoetylofenol (mCX). Ten typ cząsteczek budzi coraz większe zainteresowanie jako potencjalny nowy typ aktywnych biologicznych związków o silnym działaniu antibakteryjnym. Związki te były niedawno syntezowane na Wydziale Farmacji Uniwersytetu w Nancy, gdzie wykazano ich aktywność przeciwko gram-dodatnim i gram-ujemnym szczepom bakterii.

Swoje badania mgr Monika Orlof prowadziła w układach modelowych stanowiących uproszczony do jednej warstwy molekularnej model błony biologicznej. Do tworzenia modelowych monowarstw Doktorantka użyła dwunastu fosfolipidów i cholesterolu. Fosfolipidy charakteryzowały się różnymi grupami polarnymi (PC, PE, PG, PS), ale posiadały tej samej długości łańcuchy węglowodorowe ( $n=14$ ) lub różnej długości łańcuchy hydrofobowe ( $n=12, 14, 16, 18$ ) w przypadku fosfolipidów PE i PG.

Wybrane układy były formowane i charakteryzowane na granicy powietrze-woda z zastosowaniem techniki Langmuira. Poza charakterystykami termodynamicznymi warstw lipidowych, na podstawie izoterm  $\pi-A$ , poddanych działaniu kaliksarenów wykorzystano charakterystyki zmian potencjału powierzchniowego (izoterm  $\Delta V-A$ ) oraz rejestrowano tekstury warstw za pomocą mikroskopu Brewstera (BAM) i widma podczerwone uzyskiwane techniką PM-IRRAS (polarization modulation infrared reflection absorption spectroscopy). Dane doświadczalne zostały wsparte obliczeniami kwantowo-mechanicznymi (modelowanie molekularne) badanych układów wykonanymi za pomocą pakietu GAUSSIAN 03 z zastosowaniem funkcjonału B3LYP. Obliczenia wykonywane były na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Przedłożona do oceny praca jest zawarta na 193 numerowanych stronach z dodatkiem stron tytułowych, spisem treści i skrótów. Praca składa się z siedmiu głównych części zatytułowanych „Wprowadzenie i cel pracy”, „Część literaturowa” i „Materiały i metody badawcze” „Zestawienie wyników i ich interpretacja”, „Wnioski”, „Streszczenie” i „Bibliografia”. Pracę kończy spis publikacji i wystąpień konferencyjnych. Całość dysertacji doktorskiej zawiera

70 rysunków, 19 tabel oraz 331 cytowanych pozycji literaturowych. Rozprawa jest skomponowana bardzo poprawnie. Część literaturowa stanowiąca teoretyczne wprowadzenie oraz opis dotychczasowego stanu wiedzy zawarte jest na 50 stronach, co stanowi czwartą część pracy. Na 20 stronach opisane są stosowane związki oraz techniki pomiarowe. Pozostałe 130 strony zawierają bardzo obszerny materiał eksperymentalny i wnikliwą dyskusję uzyskanych wyników zakończoną jedenastoma wypunktowanymi wnioskami i streszczeniem całej pracy.

Pani mgr Monika Orlof rozpoczyna dysertację czterostronicowym wprowadzeniem i sformułowaniem jej celu. Rozdział „Materiały i metody badawcze”, który może być zaliczany do części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej, jest szczegółowym opisem stosowanych materiałów z ich charakteryzacją, uzasadnieniem wyboru składu i stężeń układów oraz krótkim przedstawieniem kilku stosowanych technik pomiarowych. Dla realizacji swego celu Doktorantka stosowała technikę Langmuira do wytwarzania i charakteryzowania pod względem termodynamicznym jedno- i dwu-składnikowych monowarstw na granicy faz powietrze-woda. Ponadto rejestrowała izotermy zmian potencjału powierzchniowego, kinetyki adsorpcji, mikroskopowe obrazy tekstur sprężanych monowarstw i widma absorpcyjno-odbiciowe w zakresie podczerwieni. Ta ostatnia technika jest stosunkowo nowym sposobem na rejestrację widm absorpcji w podczerwieni niezwykle przydatnym do badań monowarstw na powierzchni wody pozwalająca wyeliminować dominujący wpływ par wody na absorpcje promieniowania IR. Z tego powodu uzyskane wyniki stanowią duży wkład w zrozumienie organizacji molekuł na granicy faz powietrze-woda.

Zasadniczą część pracy stanowi rozdział zatytułowany „Zestawienie wyników i dyskusja”, w których Doktorantka w pięciu podrozdziałach opisała kompleksowanie jonów metali obecnych w subfazie przez monowarstwy pochodnych kaliksarenu z dołączonymi do dolnej części kielicha cząsteczkami antybiotyku (KI i KII), oddziaływanie pomiędzy pochodnymi kaliksarenu i cholesterolem, wpływ pochodnych kaliksarenu z podstawionymi do górnej części kielicha antybiotyku (CX) i jego monomeru (mCX) na strukturę monowarstwy fosfolipidowej. Przedstawiła charakterystykę oddziaływań cząsteczek CX z fosfolipidami o różnej strukturze łańcuchów acylowych fosfolipidów oraz wpływ pochodnej CX na dwuskładnikową monowarstwę fosfolipidów DOPE/DOPG.

Przeprowadzone badania są dobrze udokumentowane doświadczalnie z zastosowaniem komplementarnych metod eksperymentalnych i obliczeń kwantowo-mechanicznych. Materiał badawczy nie budzi zastrzeżeń.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że:

- pochodne kaliksarenu KII tworzą stabilniejsze i bardziej skondensowane warstwy niż KI a kompleksowanie z kationami metali może mieć istotny wpływ na ich działanie antybakteryjne. Kompleks KI może być efektywnym nośnikiem antybiotyku,
- istnieje oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami KI i KII a cholesterolem wpływające na stan kondensacji monowarstwy lipidowej; obecność pochodnej kaliksarenu KI wprowadza większe zaburzenie organizacji monowarstwy niż KII,
- pochodna kaliksarenu z podstawionymi cząsteczkami antybiotyku w górnej części kielicha CX i monomer mCX są rozpuszczalne w wodzie i z tego powodu adsorbują z subfazy do skompresowanej monowarstwy lipidowej. Wpływ CX na organizację monowarstwy lipidowej jest znacznie większy niż monomeru mCX, co rokuje jego dużą aktywność antybakteryjną. Wpływ CX na warstwę lipidową zależy od jej polarności i jonowości.
- w zależności od molowego udziału lipidów w mieszaninie POPE/POPG występują różnice w immobilizacji cząsteczek CX, co jest tłumaczone oddziaływaniami elektrostatycznymi.

Praca napisana jest bardzo starannie a poziom dyskusji uzyskanych rezultatów jest wysoki. Wynika to z różnorodnych technik charakteryzacji i bardzo bogatego materiału doświadczalnego. Sposób realizacji postawionego na wstępie celu badań jest dobrze przemyślany. O powyższych cechach najlepiej świadczy fakt, że wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, a więc przeszły weryfikację recenzentów.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na nieliczne elementy pracy, które wymagałyby komentarza Doktorantki.

1. Jaka jest dokładność wyznaczania powierzchni nadmiarowej oraz nadmiaru energii Gibbsa dla badanych dwuskładnikowych mieszanin? Zazwyczaj błąd jest stosunkowo duży, a przegięcia na wykresach  $\Delta G$  od ułamka molowego (Rys. 34–36 i Rys. 68) są trudne do interpretacji na poziomie molekularnym.
2. Czy parametry termodynamiczne jednoskładnikowych warstw Langmuira utworzonych przez badane fosfolipidy są zgodne z danymi literaturowymi? Brakuje odnośników do literatury, co może sugerować, że Doktorantka jako pierwsza rejestrowała i analizowała izotermy i obrazy BAM tekstur tych związków.
3. Na ile prezentowane na rysunkach (Rys. 43) kinetyki adsorpcji są rzeczywistym odwzorowaniem szybkości adsorpcji CX i mCX do monowarstwy lipidowej, a jaki jest wpływ

dyfuzji wprowadzonego roztworu pochodnych kaliksarenu (1 ml) do subfazy (330 ml).

4. Czy zmiany tekstur monowarstw lipidowych pod wpływem adsorpcji kaliksarenów nie należy tłumaczyć ich wpływem na przejścia fazowe LE–LC zamiast ogólnikowym stwierdzeniem o zaburzeniu struktury?
5. Brakuje informacji na temat rozplotu złożonych pasm absorpcji IR na składowe. Jaką przyjęto funkcję kształtu pasma i na ile składowych rozkładano dane pasma (patrz Rys. 49–52 i dalsze)?

Praca posiada bardzo nieliczne błędy edytorskie np. oporność wody 18 MΩ, niewidoczne szczegóły na rysunkach o zbyt małej rozdzielczości (Rys. 21–23). W kilku miejscach Autorka nie ustrzegła się określeń potocznych lub żargonowych np. fingerprint (str. 101), sygnały zamiast pasma absorpcji na str.126.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Dużą zaletą pracy jest zastosowanie wielu komplementarnych metod badawczych w celu dogłębnego określenia oddziaływań występujących pomiędzy związkami aktywnymi biologicznie a monowarstwą lipidową. Mgr Monika Orlof wykazała, że posiada doświadczenie w pracy badawczej, o czym świadczą wyniki pomiarów prowadzonych w laboratoriach naukowych w Polsce i Francji, które zostały opublikowane (4 publikacje) w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) oraz były licznie (10 razy) prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych. Z uwagi na ważność podjętej tematyki badań, bogaty materiał doświadczalny z zastosowaniem komplementarnych metod badawczych, współpracę międzynarodową a zwłaszcza publikacje naukowe stawiam wniosek o wyróżnienie dysertacji doktorskiej mgr Moniki Orlof.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca doktorska mgr Moniki Orlof stanowi bezspornie własne osiągnięcie Doktorantki, która w ten sposób udowodniła, że potrafi prowadzić badania naukowe. W moim przekonaniu, przedłożona mi do oceny praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2013 roku i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Moniki Orlof do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

