

Prof. zw. dr hab. inż. Adam Gadomski  
Uniwersytet Technologiczno-  
Przyrodniczy, Instytut Matematyki i  
Fizyki, Zakład Fizyki, Zespół  
Modelowania Procesów  
Fizykochemicznych,  
Al. Kaliskiego 7, 85-796 Bydgoszcz  
Tel./Fax: 52-3408697(...43)  
Email: agad@utp.edu.pl

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani Magister Inżynier Katarzyny Bernaczek  
pt. *Zastosowanie techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego  
do badania termodynamiki reakcji związków biologicznie aktywnych*,  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Zbigniewa J. Grzywny, na  
Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Pani Magister Inżynier Katarzyna Bernaczek w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej zajęła się zastosowaniem techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ang., ITC) do wszechstronnego i aplikacyjnie pożytecznego badania reakcji chemicznych związków biologicznie aktywnych.

Wszechstronności tych badań można doszukać się np. w konfrontowaniu swoich analiz, przeprowadzonych techniką ITC, z rezultatami, które oferują inne techniki badawcze, jak np. NMR, spektrofotometria UV-Vis czy też w ogóle spektrometria mas.

Aplikacyjnego pożytku należy szukać w zastosowaniu rezultatów pomiarów ITC w układzie podstawowym receptor-ligand lub też, z pewnym małym brakiem konsekwencji określonym przez Autorkę jako układ akceptor-ligand; to ostatnie pojęcie jest stosowane ze znacznie większą rozciągłością w tej rozprawie doktorskiej.

Zastosowania dotyczą przede wszystkim jakże istotnego zagadnienia kontrolowanego uwalniania leków w organizmie człowieka, a więc ważnej z punktu widzenia zdrowia człowieka farmakokinetyki. W podrozdz. II.1.5 Autorka istotnie poszerza zakres stosowania metody i techniki ITC, np. do kontrolowanego otrzymywania kryształów w skali nanometrycznej, jakże potrzebnych w urządzeniach optoelektronicznych, bądź też do badania mikroorganizmów, a także do analizy reakcji kwasów humusowych z białkami czy też wreszcie w badaniach sensoryki człowieka, podejmujących choćby jego reakcję na gorycz chininy, środka przeciw malarii – tropikalnej chorobie pasożytniczej.

Rozprawa doktorska została przedstawiona na stu dwudziestu jeden stronach – nie należy więc do bardzo krótkich; wypada formalnie zauważyć przy tej okazji, że Pani Bernaczek jest współautorką dwóch prac z tzw. listy A MNiSzW, w jednej z nich będąc pierwszą autorką, przy czym obie prace ukazały się w bardzo rzetelnych czasopiśmie międzynarodowych. Nie mniej jednak zarówno sposób zaprezentowania tematu w formie systematycznej i dydaktycznie właściwej, jak i dobór, a także zestawienie poszczególnych rozdziałów, warunkują właściwe przedstawienie podjętej tematyki. Sposób prezentacji jest logiczny, zdania nie są zbyt długie i zawarte w nich myśli celnie trafiają do czytającego tę rozprawę

recenzenta. Pewną niefrasobliwość należy jedynie wytknąć w używaniu notacji matematycznej, tj. w rezygnacji z indeksowania stałej asocjacji/dysocjacji, oznaczonej wielką literą  $K$ , lecz bez użycia indeksu dolnego z „ $a$ ” (asocjacja) lub „ $d$ ” (dysocjacja), prawie w całej rozprawie, czyli poniekąd konsekwentnie, aczkolwiek niewłaściwie z matematycznego punktu widzenia. Podobną sytuację obserwujemy także przy oznaczeniu na objętość celki pomiarowej, co – jako wyrażenie matematyczne – przypomina iloczyn wielkości arbitralnych: stężenia  $c$  i objętości  $V$ . Przy okazji, co do pewnych matematycznych nieścisłości, to równania R.15 i R.16 wydają się być poprawne, ale przyjęta w nich notacja nie zgadza się dobrze z określeniem występujących w nich wielkości, np.  $X$  lub też, że  $r$  (odwrotność parametru Wisemana, ozn. przez  $c$  – widać tu dalszą kolizję notacyjną z tym co podano wyżej) nie występuje w żadnym z równań, więc po co tę wielkość w ogóle wprowadzać? Jasną interpretację jako swoisty współczynnik modelowania kształtu krzywej sigmoidalnej z pomiaru ITC ma współczynnik Wisemana  $c$  i to powinno wystarczyć.

W rozprawie godne podkreślenia są dwie następujące sprawy. Po pierwsze, bardzo systematyczne przedstawienie – na wybranych przykładach własnych - zastosowań techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do badania reakcji chemicznych związków biologicznie aktywnych. Systematyczność ta polega na tym, że Autorka metodą od ogółu (rozdziały I i II, poświęcone ciekawemu wprowadzeniu do tematyki oraz dobrze przemyślanemu przeglądowi stanu badań nad tą tematyką) do szczegółu (rozdziały III-V, stanowiące jądro tej rozprawy, tj. badania własne Autorki wraz z określeniem ich celu, podsumowaniem i wnioskami), wprowadziła nas w świat zastosowań termodynamiki stanów równowagi do opisu ważnych z punktu widzenia zastosowań reakcji chemicznych, z użyciem polimerów gwiazdzistych lub też jonów metali. (Należy także dodać, że czytanie pracy bardzo ułatwia *Wykaz Akronimów, Skrótów i Symboli*.)

Po drugie, Autorka w sposób zamierzony i niezwykle celny podnosi kwestie pewnego zaniedbania ze strony chemików i fizyków (a może nawet zbyt małej ambicji) używania klasycznego formalizmu termodynamiki do opisu złożonych reakcji chemicznych, jakie przedstawiono w tej rozprawie. Wskazuje na to swoiste zaniedbanie w silnej łączności z zastosowaniem metody ITC, próbując, i to udanie, przekonać nas, że mamy oto tutaj do dyspozycji taką metodę, dobrze opartą o podstawy termodynamiki biochemicznej, a stosujemy ją niezbyt często, bo są inne, bardziej wyszukane, modne i technicznie zaawansowane, jak NMR lub też spektrometria mas, itd. Co najważniejsze jednak, Autorka rzetelnie pokazuje w rozdz. IV, na przykładzie oddziaływania FITC, DOX oraz MTX z polimerami gwiazdzistymi, a także oddziaływania glikokoniugatów z dwuwartościowymi jonami manganu, do jakiego momentu można dojść w sposób kontrolowany, aby móc wzmiankowany już formalizm termodynamiczny bezpiecznie zastosować.

Podjęte w ten sposób zagadnienie zawiera swoją bezsprzeczną logikę. Autorka, po pierwsze, ocenia w sposób ilościowy, że wszystkie wymienione wyżej oddziaływania, choć posiadają charakter mieszany, bo zarówno chemiczny, jak i fizyczny, zachodzą w sposób nieodwracalny i samorzutny, z ujemną wartością entalpii swobodnej Gibbsa. Po drugie, z pomiaru kalorymetrycznego Autorka jest w stanie wyznaczyć ciepło reakcji chemicznych, które jawi się pewną addytywną funkcją podstawowych wkładów cieplnych tej reakcji, zarówno o egzo-, jak również o endotermicznym charakterze. Tylko – po trzecie wreszcie - w przypadku oddziaływania FITC proces ma dominantę entalpową, związaną z kreacją wiązań chemicznych o znanym charakterze, podczas gdy w pozostałych przypadkach pojawia się subdominantą entropową, która kieruje proces w stronę jego entropowego, mającego większą liczbę stopni swobody charakteru. Zaczynają się pojawiać efekty fizyczne typu hydrofobowego, konformacyjne właściwości molekuł dochodzą do głosu (tu: globularność chociażby), itp. W tym miejscu piszący tę recenzję wołaliby jednak w Tabelach, począwszy np. od Tabeli 4.5 w ostatniej kolumnie widzieć wielkość, która ma ten sam wymiar fizyczny, jak pozostałe, z którymi się ona porównuje, tj. iloczyn temperatury i zmiany entropii, co

Autorka rozprawy zastosowała dopiero w Tabeli 4.25 – zabrakło w przypadku pewnej konsekwencji, bo przecież sama, rozpatrywana tu zmiana entropii, nie jest przypadającą na 1 mol substancji energią, a staje się nią po pomnożeniu przez temperaturę.

Czego Autorowi tej recenzji nieco brakło w tej pracy, to jest analiza towarzyszących reakcji wiązań, głównie kowalencyjnych lub koordynacyjnych (czy w układach z rozpuszczalnikiem wodnym nie pojawiają się też wodorowe, słabsze, ale jakże ważne z punktu widzenia procesów życiowych?), ko-efektów natury fizycznej: agregacyjnych; molekularno-konformacyjnych; adhezyjno-hydrofobowych, zmieniających efektywną objętość wolumenu reakcji chemicznej, wprowadzających dyspersyjność środowiska reakcji.

Natura wymienionych właśnie ko-efektów może stanowić bazę interpretacyjną w dalszych badaniach z użyciem metodologii ITC. Po pierwsze, zawiązując się tylko do efektu zmiany konformacji cząsteczki, możemy rozumować, że stoi za tym jakaś praca,  $W$ , wykonana przez niezerównoważoną siłę, wywodzącą się z otoczenia reakcji, a skutkującą zmianą konformacji układu. Zgodnie z całkiem niedawno podjętymi badaniami nad tego typu procesami Christopherowi Jarzyńskiemu zawdzięczamy, że wielkość  $W$  jest równa zmianie energii swobodnej tego małego molekularnego układu, liczonego wraz z otoczeniem. Zmiana energii swobodnej jest jednak wielkością termodynamiczną o równowagowym charakterze – obserwujemy więc na poziomie molekularnym, a być może i supramolekularnym (agregacji molekularnej jako takiej „sieci” cząsteczkowej) zunifikowanie się obu typów termodynamiki. Takie rozumowanie, i tutaj jestem ciekaw zdania Autorki rozprawy, może się przydać w interpretowaniu niektórych pomiarów ITC, jak choćby te z subdominantą entropową w tle. Por. doświadczenia C. Bustamante i współautorów, np. w Jan Liphardt i in., *Science* 07 June 2002: Vol. 296, Issue 5574, pp. 1832-1835 DOI: 10.1126/science.1071152.

Efekty sieciowo-agregacyjne mogą też prowadzić do manifestowania się kinetyki dyspersyjnej, wg założeń której uzmiennią się, uzależnią od czasu dochodzenia do stanu równowagi (o ile równowaga zostanie osiągnięta) „stałe kinetyczne” używane w modelowaniu: użyte modele zostały przedstawione w rozdz. II rozprawy. W języku farmakokinetyki może to prowadzić do odstępstw lub anomalii w stosunku do modelu Higuchiego, przypominających bardziej model Korsenmayera-Peppasa, równ. R.2.41 – czy Autorka rozprawy zgadza się i w jakim stopniu z takimi przewidywaniami?

Reasumując, w rozprawie bardzo rzetelnie pokazano, a nawet udowodniono przydatność metodologii ITC do analizy szeregu oddziaływań związków biologicznie aktywnych. Wskazano na ograniczenia zakresu badań prowadzonych techniką ITC (np., agregacja molekularna, włączanie się efektu hydrofobowego, niejednoznaczność w ocenie wolumenu obszaru reakcji) oraz zwrócono baczną uwagę na istotę warunków ich doboru. Przedyskutowano również problemy, które można napotkać podczas analizy termodynamicznej różnorodnych oddziaływań o naturze zarówno chemicznej, jak i fizycznej. Uwypuklono wpływ mechanizmu stechiometrycznego reakcji chemicznej na wartości wielkości termodynamicznych badanych zjawisk oraz ich naturę podczas interpretacji danych otrzymanych z pomiarów ITC.

Z bardzo nielicznych, jak na dość dużą objętość rozprawy usterek o charakterze technicznym bądź typograficznym, należy wymienić błędy w referencjach literaturowych, por. ref. [54] lub [27], gdzie pozostawiono dwa znaki zapytania w miejscu przeznaczonym na pewną literę z alfabetu niemieckiego.

Wzmiankowane wyżej, a przecież w sumie bardzo nieliczne uchybienia o charakterze przede wszystkim technicznym, nie umniejszają jednak istotnie bardzo porządnie przeprowadzonej redakcji poddanej ocenie rozprawy.

## PODSUMOWANIE

W podsumowaniu recenzji, uważam, że praca doktorska Pani Magister Inżynier Katarzyny Bernaczek pt. *Zastosowanie techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do badania termodynamiki reakcji związków biologicznie aktywnych*, wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Zbigniewa J. Grzywny, spełnia kryteria istotności podjętego problemu praktycznego mieszającego się w zakresie metodologii ITC oraz podstaw termodynamiki chemicznej, jakim jest zastosowanie techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do badania reakcji związków biologicznie aktywnych.

Stanowi to podstawę do stwierdzenia, że powierzona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia w sposób jednoznaczny wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, wraz z późniejszymi zmianami. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani Magister Katarzyny Bernaczek, Autorki rozprawy pt. *Zastosowanie techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do badania termodynamiki reakcji związków biologicznie aktywnych*, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adam Gadomski

