



Kraków 05.02.2021

UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

prof. dr hab. Paweł Korecki  
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej  
Uniwersytet Jagielloński  
Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków  
Tel: +48 12 664 4627  
e-mail: pawel.korecki@uj.edu.pl

Wydział

Fizyki

Astronomii

i Informatyki

Stosowanej

**Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Diany Kalinowskiej  
pt. „Wyznaczenie struktury molekularnej związków o potencjale  
farmakologicznym z wykorzystaniem metodologii bazującej na  
rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej”  
napisanej pod kierunkiem dr. hab. Marcina Klepki**

Obliczenie widma absorpcji rentgenowskiej dla związku o znanej strukturze jest zadaniem stosunkowo prostym. Problem odwrotny tj. wyznaczenie skomplikowanej trójwymiarowej struktury molekularnej związku na podstawie widma absorpcji rentgenowskiej jest zadaniem znacznie trudniejszym. Widmo absorpcji to dane jednowymiarowe, a liczba parametrów strukturalnych, które można wyznaczyć z pojedynczego widma absorpcji rentgenowskiej jest ograniczona. Dodatkowo, analiza struktury jest utrudniona przez skomplikowane procesy rozpraszania elektronów o niskich energiach. Dlatego też proces wyznaczania struktury jest często prowadzony zmuszonymi metodami prób i błędów.

W swojej pracy doktorskiej pani mgr Diana Kalinowska wyznacza strukturę molekularną, a właściwie proponuje modele strukturalne, czterech serii niekryształicznych związków metal-ligand: pochodnych tetrazolu z jonami miedzi oraz srebra. Ligandami użytymi w reakcjach były dwa tautomery: 1-(2-fluorophenyl)-N-(4-methoxyphenyl)-1H-tetrazol-5-amine (MD) oraz N-(2-fluorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-1H-tetrazol-5-amine (MG). Głównym narzędziem badawczym jest promieniowanie synchrotronowe, a kluczowe techniki badawcze to metody absorpcji rentgenowskiej w obszarach EXAFS i XANES.

W badaniach strukturalnych autorka wykorzystuje metodologię opracowaną w Zespole Spektroskopii Rentgenowskiej i Mikroanalizy Instytutu Fizyki PAN, która pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji o badanych systemach oraz w pełni scharakteryzować strukturę badanych układów metal-ligand organiczny. Te niezbędne dodatkowe informacje pochodzą zarówno z badań przeprowadzonych komplementarnymi metodami eksperymentalnymi, z obliczeń teoretycznych jak i z strukturalnych baz danych.

ul. prof. Stanisława

Łojasiewicza 11

PL 30-348 Kraków

tel. +48(12) 664-48-90

fax +48(12) 664-49-05

e-mail:

wydzial.fais@uj.edu.pl

Jak pisze Autorka, podstawową motywacją badań opisanych w rozprawie doktorskiej jest określenie zależności między aktywnością biologiczną (tj. aktywnością mikrobiologiczną i cytotoksyczną) danego związku a jego strukturą chemiczną. W tym celu w pracy zaprezentowane są wyniki niezależnych eksperymentów biochemicznych.

Do największych plusów pracy należy zaliczyć fakt, że strukturę udało się wyznaczyć dla związków w postaci niekryształicznej tj. nienadającej się do badań dyfrakcyjnych oraz to, że badano związki w roztworach tj. w warunkach zbliżonych do warunków *in vivo*. Na pochwałę zasługuje także fakt, że doktorantka samodzielnie zsyntetyzowała badane przez siebie kompleksy metodą elektrochemiczną.

Do największych minusów zaliczam fakt, że z pracą doktorską nie są powiązane żadne publikacje naukowe. Mam nadzieję, że publikacje takowe powstaną w przyszłości, co pozwoli na zweryfikowanie zaproponowanych modeli strukturalnych przez środowisko naukowe.

Praca napisana jest w języku polskim i składa się z pięciu rozdziałów (pierwszy to streszczenie), podsumowania i trzech suplementów (łącznie nieco ponad 100 stron). Spis literatury zawiera 119 pozycji. Niestety, korzystanie ze spisu literatury nie jest ani łatwe, ani przyjemne. Autorka zdecydowała się na absolutnie minimalistyczny format spisu literatury, który w zasadzie nie jest w dzisiejszych czasach stosowany w żadnym czasopiśmie. Brak jest tytułów artykułów, pełnej listy autorów, nie wspominając o hyperlinkach w wersji elektronicznej. Wyszukiwanie pozycji literaturowych jest zatem czasochłonne i uciążliwe.

Pierwszy rozdział pracy to „Abstrakt”, który dobrze streszcza pracę. Rozdział 2 to „Wstęp”, w którym Autorka przedstawia motywację pracy i bardzo skrótowo opisuje kompleksy bioaktywnych związków organicznych z jonami metali, głównie w kontekście poszukiwania nowych leków. Rozdział 3 zatytułowany „Metodologia” to opis podejścia Autorki do analizy widm absorpcji rentgenowskiej. W rozdziale tym przedstawione są też elementarne informacje dotyczące promieniowania rentgenowskiego oraz promieniowania synchrotronowego, techniki absorpcji rentgenowskiej, syntezy związków, jak i obliczeń teoretycznych i zastosowanych technik biochemicznych.

Rozdział 4 ma nieco mylący tytuł „Część eksperymentalna i metodyka analizy danych”, a materiał w nim jest wymieszany. Zwyczajowo część dotycząca opisu zastosowanych metod i rezultatów badań umieszcza się w osobnych rozdziałach. W rozdziale 4 zawarte są jednak zarówno opis syntezy związków, opis metod eksperymentalnych związanych z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego oraz, co nieco mnie dziwi, wyniki uzyskane z pomocą metod biochemicznych

W rozdziale tym Autorka przedstawia porównawcze wyniki testów cytotoksyczności i aktywności mikrobiologicznej badanych związków, zarówno dla wyjściowych ligandów jak i kompleksów metal-ligand. W przypadku badań

cytotoksyczności materiał badawczy stanowiły ludzkie linie komórkowe pierwotnego i przerzutowego raka jelita grubego, ludzka linia komórkowa przerzutowego raka prostaty, ludzkie unieśmiertelnione keratynocyty oraz fibroblasty chomika pobrane z tkanki płucnej. Dodatkowe informacje dot. tych badań przedstawione są w Suplemencie A. Autorka zaobserwowała podwyższoną, choć silnie zróżnicowaną aktywność biologiczną metalokompleksów, w stosunku do ligandów. Największy efekt cytotoksyczny spośród badanych metalokompleksów wykazały kompleksy srebra. Selektywne działanie przeciw przerzutowej linii komórkowej raka prostaty wykazały natomiast kompleksy miedzi. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono zarówno dla wybranych bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. W szczególności wskazano, że kompleksy jonów srebra wykazały aktywność przeciwbakteryjną porównywalną ze stosowanymi obecnie antybiotykami.

Intuicja podpowiada mi, że powyższe wyniki są ciekawe, a Autorka poprawnie je interpretuje. Niestety nie są podane niepewności statystyczne uzyskanych wyników. Z Suplementu A wynika, że Autorka przeprowadziła analizę statystyczną z użyciem programu Statistica oraz programu EXCEL, a wyniki przeżywalności przedstawiła jako średnią arytmetyczną z odchyleniem standardowym ( $\pm$  SD). Podany jest także użyty poziom istotności statystycznej. Niestety nigdzie nie znalazłem ani wartości niepewności statystycznych, ani informacji jakich testów statystycznych użyto i do testowania jakich hipotez były one używane. Spodziewam się, że podczas publicznej obrony Doktorantka wyjaśni te poważne niedociągnięcia. Dodatkowo, na stronie 53 w kolejnych trzech liniach stężenie podane jest z użyciem 3 różnych jednostek; to również wymaga wyjaśnienia.

Rozdział 5 to najważniejsza część pracy tj. wyniki opisujące strukturę molekularną układów ligand organiczny-metal, gdzie metalem jest Cu(II) i Ag(I). W przypadku kompleksów z jonami miedzi pomimo, że metody pomocnicze (spektroskopia w podczerwieni i analiza elementarna) nie dostarczyły wielu pomocnych informacji, Autorce udało się uzyskać bardzo dobrą zgodność danych pomiarowych z modelem teoretycznym i w efekcie z dużym prawdopodobieństwem zaproponować wiarygodny model strukturalny badanych związków. Autorka nie zauważyła istotnych różnic dla próbek w postaci proszkowej i w postaci roztworów. We wszystkich przypadkach tj. dla kompleksów (MD i MG) zaobserwowano strukturę jednordzeniową.

W przypadku kompleksów z jonami srebra, Autorka uzyskała bardzo ciekawy wynik eksperymentalny. Dla próbek w postaci proszkowej i w postaci roztworów widma absorpcji miały istotnie różny kształt. Tym samym pokazano, iż cząsteczki wody istotnie modyfikują strukturę molekularną badanych metalokompleksów z jonami srebra. W przypadku kompleksów z jonami srebra Autorka zaproponowała modele struktury, osobno dla próbek proszkowych i roztworów. W obu przypadkach zaproponowano różne dwurdzeniowe modele struktury. O ile w przypadku próbek proszkowych uzyskano dobrą zgodność krzywych teoretycznych i eksperymentalnych XANES, to rozbieżności dla roztworów są duże. Pomimo to uważam, że

zaproprowane modele mogą być dobrym punktem startowym do tzw. udokładnienia struktury.

Z obowiązku przedstawiam drobniejsze uwagi krytyczne. Na stronie tytułowej po tytule doktorantki pojawia się niepotrzebnie kropka. Co najmniej raz Autorka odnosi się do złego rysunku (str. 55, rys 22b). Prawo Lamberta-Beera pojawia się w tekście dwa razy, a wystarczyło je umieścić jako numerowany wzór. Na stronie 25 Autorka „opisuje ... opis”.

Podsumowując, uważam że przedstawiona praca doktorska zawiera ciekawe i oryginalne wyniki i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Diany Kalinowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mam też nadzieje, że podczas publicznej obrony Autorka przedstawi dodatkowe informacje, o które proszę w recenzji i ustosunkuje się do moich uwag krytycznych.



Paweł Korecki