



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Prof. dr hab. Ewa Gudowska-Nowak  
Instytut Fizyki im. M. Smoluchowskiego  
ul. S. Łojasiewicza 11  
30-048 Kraków

Kraków, 16.11.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
pani mgr inż. Katarzyny Bernaczek**

*Zastosowanie techniki izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do badania termodynamiki reakcji związków biologicznie aktywnych*

Celem projektu doktorskiego pani mgr Katarzyny Bernaczek było wykazanie przydatności metody izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) w badaniach oddziaływań pomiędzy wybranymi grupami polimerów i substancjami aktywnymi biologicznie. Technika kalorymetryczna ITC pozwala na bezpośredni pomiar zmian energetycznych jakie towarzyszą procesom zachodzącym w stałej temperaturze i pod stałym ciśnieniem atmosferycznym w trakcie miareczkowania. Ponieważ praktycznie wszystkim procesom fizycznym i chemicznym towarzyszą efekty wydzielania lub pochłaniania ciepła, technikę kalorymetryczną można uznać za uniwersalną metodę określania ciepła takich przemian. W miareczkowaniu kalorymetrycznym możliwe jest wyznaczenie parametrów termodynamicznych reakcji chemicznej, tj. stechiometrii, stałej asocjacji, zmiany entalpii i zmiany entropii. Dodatkowo posiłkując się powtarzalnymi doświadczeniami prowadzonymi w różnych temperaturach, można z nich uzyskać informację o zmianie pojemności cieplnej. Znajomość wspomnianych parametrów i funkcji termodynamicznych pozwala zatem nie tylko zrozumieć charakter zachodzących przemian fizykochemicznych, ale także zbadać czynniki wpływające na trwałość powstających wiązań czy kinetykę reakcji chemicznych. Jednocześnie badanie techniką ICT oddziaływań międzycząsteczkowych jest wolne od ograniczeń na np. masę

reagentów, czy też przeźroczystość roztworu, co stanowi o przydatności tej metody jako uzupełnienia lub alternatywy dla innych technik pomiarowych.

W projekcie doktorskim pani Bernaczek jako przykładowe substancje biologicznie aktywne użyto izocyjanian fluoresceiny (FITC) – barwnik powszechnie stosowanego w metodach immunofluorescencyjnych; doksorubicynę (DOX) i metotreksat (MTX) - powszechne farmaceutyki przeciwnowotworowe oraz glikokoniugaty mogące posłużyć za inhibitory glikozylotransferaz. Termodynamikę oddziaływań związków FITC, DOX i MTX z polimerami analizowano przez zastosowanie w projekcie związków polimerów gwiaździstych będących potencjalnymi nośnikami leków.

Z tego punktu widzenia, zaplanowanie odpowiedniej strategii eksperymentu ITC pozwalającej na stwierdzenie charakteru i siły oddziaływań polimerów z wybranymi substancjami leczniczymi jest istotnym źródłem informacji dla projektowania dedykowanego procesu produkcji farmaceutycznej. Przedstawiona do oceny rozprawa ma zatem bardzo wyraźny charakter aplikacyjny.

Rozprawa składa się z 5 rozdziałów, w tym krótkiego wprowadzenia do przedmiotu badań, części literaturowej poświęconej omówieniu metody ITC i modeli matematycznych służących interpretacji danych oraz 3 rozdziałów przedstawiających wyniki badań własnych i ich podsumowanie. Dopełnieniem rozprawy jest bogata literatura przeglądowa (około 200 pozycji). Układ taki sprzyja czytelnemu rozdzieleniu opisu techniki badawczej od tej części rozprawy, która poświęcona jest wynikom oryginalnych badań doświadczalnych prowadzonych przez Doktorantkę. Tym niemniej uważam, że cele badawcze powinny być w punktach przedstawione we wstępnej części rozprawy, a nie dopiero w Rozdziale III.

Pochwalam starannie przedstawioną metodykę pracy oraz omówienie prostych modeli matematycznych opisujących typy oddziaływań międzymolekularnych testowanych techniką ICT (Rozdział II). W tej części pracy spodziewałabym się jednak szerszego potraktowania informacji płynących z analizy krzywej Wisemana. Kształt tej izotermy jest dobrze zdefiniowany przez punkt przegięcia. Jak zatem powiązać nachylenie izotermy Wisemana ze zmianami entalpii i w jaki sposób odnieść je do parametru  $c$  wprowadzonego wzorem R.2.5? Czy można wyestymować parametry powinowactwa i entalpii wprost z oglądu krzywej? Z jaką dokładnością? Te informacje powinny być się znaleźć w opisie metody, zwłaszcza w odniesieniu do pokrótce omówionych modeli oddziaływań (Rozdział II 1.4). Poza wspomnianą przez Autorkę pracą Indyka i Fishera [38] dyskutującą ten aspekt, polecałabym publikację "Geometric features of the Wiseman isotherm" autorstwa A. Velazquez-Campoy (J. Ther. Anal. Calorim. 2015, 122:1477) obszernie omawiającą geometryczną analizę wspomnianej krzywej.

Wielkości termodynamiczne wyznaczone podczas miareczkowania FITC do roztworów polimerów omówione zostały w Rozdziale IV2.1. Zwrócono uwagę na egzotermiczny charakter badanych reakcji i wskazano na ograniczoną dostępność grup aminowych polimeru do reakcji z FITC przy tworzeniu II rzędowej struktury polimeru.

W kontekście zastosowań polimerów gwiazdzistych jako nośników, Autorka konkluduje "najlepsze wyniki ze względu na 56% wysycenie grup aminowych i stałą równowagi reakcji ... uzyskano dla polimeru PVIII..." Wniosek ten powinien być oparty o wcześniejszą analizę (omówienie) pożądanych termodynamicznych cech nośnika (wysoka wartość stałej równowagi przemiany, etc.). Kryteria takie nie zostały w pracy wypunktowane w Rozdz. II.2.1, a jedynie opisane jakościowo.

Ciekawym wynikiem projektu jest stwierdzenie endotermicznego efektu cieplnego pochodzącego od tworzącego się wiązania amidowego w reakcji koniugatów polimerowych z MTX oraz stwierdzenie entropowego charakteru wiązania chemicznego MTX przez polimery. Mimo niemożności wyznaczenia wielkości termodynamicznych reakcji DOX-nośnik polimerowy, opis prawdopodobnych oddziaływań i agregacji DOX w roztworze wodnym uważam za ważny akcent pracy, wskazujący na występujące w tym wypadku istotne ograniczenia przyjętej metody badawczej. Podobnie oceniam opis termodynamiki reakcji kompleksowania jonów magnezu przez potencjalne inhibitory glikozylotransferaz. Przeprowadzona w tym zakresie analiza wykazała, że technika ITC może posłużyć do wstępnej selekcji glikokoniugatów do dalszych badań enzymatycznych.

Ogólnie, rozprawa wyczerpująco dyskutuje różnorodność oddziaływań, jakie można badać techniką ITC na poziomie mezoskopowym i dowodzi możliwości pozyskania tą drogą cennych informacji dla projektowania związków o pożądanych własnościach termodynamicznych czy kompleksotwórczych. Szeroko dyskutuje też i wskazuje na trudności interpretacyjne napotymane przy badaniu oddziaływań substancji biologicznie aktywnych.

Wśród uwag krytycznych odnoszących się do treści rozprawy wymienię:

1. W opisie techniki ITC na stronie 3, w zdaniu "W takich warunkach całkowity efekt cieplny równy jest zmianie standardowej entalpii przemiany" powinno być "zmianie swobodnej entalpii przemiany" bądź po prostu "entalpii (potencjału) Gibbsa".
2. Ciepło całkowite R.2.20 powinno być oznaczone odmiennym symbolem (np.  $Q_{tot}$ ) niż we wzorze R.2.18
3. Nie znalazłam bezpośredniego związku z opisem dyfuzji reagentów, kontroli DDS oraz opisem termodynamiki badanych w projekcie proce-

sów. Uwagi w tym zakresie można było przedstawić w końcowej fazie rozprawy, dyskutującej potencjalne poszerzenie tematyki badawczej z komplementarnym użyciem ITC i innych technik pomiarowych.

4. Badania ITC obciążone mogą być błędami systematycznymi i niepewnościami statystycznymi. Praca powinna zwięźle podać źródła obydwu, tymczasem omówienie błędów jest w rozprawie raczej skromne. Dla porównania polecam *Evaluation and minimization of uncertainty in ITC binding measurements: Heat error, concentration error, saturation and stoichiometry*, S.A. Kantonen et al. *Biochim. Biophys. Acta* 2017, 1861: 485.

Wyniki rozprawy doktorskiej zostały w części opublikowane w 2ch pracach, przy czym w jednej z nich pani mgr inż. Katarzyna Bernaczek jest pierwszym autorem. Przedstawiono w nich skuteczność badań ITC w ocenie klasyfikacji syntetycznych polimerów jako nośników substancji czynnych biologicznie i wskazano kierunki dalszych badań w tym zakresie. Biorąc to pod uwagę, stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia ustawowe wymagania odnoszące się do zakresu i oryginalności rozwiązania problemu naukowego stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Prof. dr hab Ewa Gudowska-Nowak

