

Prof. dr hab. Waclaw L. Kołodziejski
Katedra i Zakład Chemii
Nieorganicznej i Analitycznej
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM)

Warszawa, 25 stycznia 2016 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Pawlaka

pt. „Zastosowanie spektroskopii NMR w ciele stałym i metod obliczeniowych w badaniach nieuporządkowania molekularnego w kryształach peptydów i polimerów syntetycznych”.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje badania wykonane w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Marek Potrzebowski z CBMiM PAN.

Rozprawa doktorska mgr. Pawlaka stanowi spójny tematycznie zbiór sześciu artykułów opublikowanych w latach 2012-2015 w znanych międzynarodowych czasopismach naukowych z zakresu chemii fizycznej i fizyki chemicznej. Łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor - IF) tych prac jest wysoki, gdyż wynosi 21,9. Prace były cytowane 34 razy (według bazy Web of Science, bez autocytowań). W pięciu artykułach mgr Pawlak jest pierwszym autorem, a w jednym drugim autorem. Z załączonych do rozprawy oświadczeń współautorów wynika, że Doktorant miał dominujący wkład w zaplanowanie i wykonanie badań, interpretację ich wyników oraz w przygotowanie publikacji. Wobec tego rozprawa doktorska mgr. Pawlaka spełnia warunki Art. 13, p. 4 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami, którą dalej będę nazywał krótko Ustawą. Zgodnie z Ustawą „rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy...”. Wymieniony zbiór artykułów jest poprzedzony obszernym omówieniem (66 stron), na który składają się streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp omawiający motywację Autora do podjęcia badań, cele pracy, metodologia i wyniki badań oraz ich podsumowanie. Następnie przedstawione są kolejno: spis i kopie publikacji składających się na rozprawę, oświadczenia współautorów, spis wszystkich publikacji mgr. Pawlaka i jego CV naukowe oraz bibliografia. Całość rozprawy ma formę opracowanego maszynopisu zawierającego spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów będących podstawą dysertacji, co jest zgodne z formalnymi wymogami Art. 13, p. 2 Ustawy.

Głównym celem pracy doktorskiej było rozwinięcie metodologii badań nieuporządkowania molekularnego z wykorzystaniem wysokorozdzielczej spektroskopii NMR w ciele stałym (ssNMR) oraz obliczeń kwantowo-chemicznych. Podjęcie tej tematyki uważam za w pełni uzasadnione. Nieuporządkowanie molekularne w kryształach molekularnych materiałów syntetycznych i naturalnych jest ważnym problemem, wpływającym czasami poważnie na ich właściwości fizykochemiczne i możliwości aplikacyjne, a także na działanie biologiczne w przypadku biomateriałów i substancji czynnych leków. Podobny cel badań obrali sobie już przed mgr. Pawlakiem inni naukowcy i próbowali go realizować swoimi specyficznymi metodami badawczymi. Oryginalność pracy Doktoranta polega moim zdaniem przede wszystkim na wykorzystaniu (1) metody obliczeniowej GIPAW (ang. *Gauge Including Projector Augmented Waves*), (2) analizie anizotropii przesunięcia chemicznego (w szczególności parametru *span* tensora ekranowania) w aspekcie nieuporządkowania molekularnego i dynamiki molekularnej oraz (3) zastosowaniu szybkiego wirowania próbki ssNMR pod kątem magicznym (MAS). Trzeba tu zaznaczyć, że sprawy nieuporządkowania molekularnego i dynamiki molekularnej ściśle się łączą w pracy mgr. Pawlaka. Zostały zbadane na dobrze wybranych materiałach modelowych: tripeptydach Tyr-D-Ala-Phe i Tyr-L-Ala-Phe, tetrapeptydzie Tyr-D-Ala-Phe-Gly, pentapeptydach Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (met-enkefalina) i Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (leu-enkefalina), α -poli(L,L-laktydzie) dalej oznaczanym skrótem α -PLLA i usieciowanych polimerach krzemooorganicznych (ang. *polyhedral oligomeric silsesquioxane*, skrót POSS).

Metoda GIPAW jest rozwinięciem klasycznej metody DFT na układy periodyczne i jak już wcześniej stwierdzono, znacznie poprawia dokładność obliczeń przesunięć chemicznych dla kryształów małych związków organicznych. Rzeczywiście, jak pisze Doktorant, nie była jeszcze używana do obiektów makromolekularnych. Dlatego mgr Pawlak postanowił przetestować ją na związkach o rosnącej masie molowej (od peptydów do polimerów, *vide supra*) i wykorzystać ją do przypisania sygnałów ssNMR oraz co bardziej istotne i zdecydowanie nowatorskie, do badania dynamiki nieuporządkowania molekularnego przez porównanie z eksperymentalnymi parametrami ssNMR. Bardzo podoba mi się ta przemyślana koncepcja badań. Szczególnie wartościowym, oryginalnym ich wynikiem jest wykazanie, że wyższą wartość obliczonego parametru *span* tensora przesunięcia chemicznego węgla-13 w stosunku do obserwacji eksperymentalnych można powiązać z dynamiką molekularną w danym obszarze cząsteczki. Metoda obliczeniowa GIPAW została z powodzeniem zastosowana w procedurze zwanej krytalografią NMR. W ten sposób mgr Pawlak udokładził strukturę α -PLLA w stosunku do struktury dyfraktometrycznej, otrzymanej przez innych badaczy techniką dyfrakcji neutronowej, uzyskując dobrą zgodność symulowanego i eksperymentalnego widma ^{13}C MAS NMR. Jest to

pierwszy znany mi przypadek zastosowania krystalografii NMR do udokładnienia struktury krystalograficznej polimeru.

Postęp w konstrukcji głowic MAS NMR umożliwia coraz szybsze wirowanie próbki pod kątem magicznym, nawet ponad 100 kHz (tzw. *ultra-fast MAS*). Wobec tego staje się możliwa bardziej efektywna redukcja lub całkowita eliminacja (w zależności od szybkości wirowania i rodzaju materiału) poszerzających sygnały ssNMR oddziaływań anizotropowych. Jest to wyjątkowo ważne w przypadku silnych homojądrowych sprzężeń dipolowych ^1H - ^1H poszerzających linie protonowego ssNMR i wpływających także poprzez „współdziałanie” z heterojądrowymi sprzężeniami ^1H - ^{13}C na szerokość linii ssNMR węgla-13. Wobec tego przy bardzo szybkim wirowaniu stają się możliwe nowe, dwuwymiarowe eksperymenty ssNMR, coraz bardziej przypominające rozdzielczością eksperymenty cieczowe.

Pan Pawlak w pełni wykorzystał unikalne wyposażenie aparaturowe ssNMR macierzystej jednostki (możliwość wirowania próbki do ok. 60 kHz) i swoje umiejętności w stosowaniu najnowszych sekwencji impulsowych, zdobyte pod opieką promotora prof. Marka Potrzebowskiego. W rozprawie i w załączonych publikacjach, będących jej podstawą, znajdujemy widma 2D ssNMR o bardzo dobrej jakości i wielkim potencjale interpretacyjnym, jeśli chodzi o badane obiekty. Zostały one właściwie dobrane do rozwiązania konkretnych problemów i zarejestrowane zarówno z klasycznymi częstościami MAS, np. ^1H - ^{13}C PILGRIM i ^1H - ^{13}C PISEMA (MAS przy 13 kHz), jak i z szybkim wirowaniem (MAS przy 55 kHz, tzw. *fast MAS*), np. ^{13}C - ^{13}C SHANGHAI oraz ^1H - ^{13}C i ^1H - ^{15}N HETCOR z detekcją typu *inverse* i wykorzystaniem różnych czasów kontaktu odwrotnej polaryzacji skrośnej (CP) od jąder rzadkich do protonów. Chociaż wymienione sekwencje impulsowe ssNMR zostały opracowane wcześniej przez innych autorów, to ich wykorzystanie do badań strukturalnych takich obiektów, w takim zakresie i do takich celów jak w prezentowanej pracy uważam za nowość naukową. Należy jeszcze podkreślić, że w Polsce tego rodzaju eksperymenty ssNMR są wykonywane tylko w grupie badawczej prof. Potrzebowskiego.

Doktorant poświęcił również dużo uwagi dodatkowym pracom, niezbędnym do wykonania swoich nowatorskich badań lub do ich uzupełnienia, względnie weryfikacji ich wyników. Zastosował wzbogacenie próbek w węgiel-13 i deuter. Rejestrował statyczne widma ^2H ssNMR metodą echa kwadrupolowego i analizował je w funkcji temperatury w aspekcie dynamiki molekularnej przez porównanie z widmami symulowanymi programem EXPRESS. Na wybranych przykładach tripeptydów porównał klasyczną metodę obliczeniową DFT, metodę ONIOM i metodę GIPAW. Okazało się, że metoda GIPAW daje najlepszą zgodność z wynikami eksperymentalnymi.

Praca doktorska mgr. Pawlaka jest więc bardzo bogata pod względem innowacji metodycznych, a ponadto zawiera wiele nowych, ciekawych informacji strukturalnych dotyczących badanych obiektów. Mnie szczególnie zainteresowała sprawa zachowania struktury krystalicznej badanego tetrapeptydu po jego odwodnieniu. Desolvatacja zwykle powoduje zmianę struktury krystalicznej lub powstanie formy amorficznej. Tutaj mamy do czynienia z zachowaniem struktury krystalicznej, czyli izomorficznością solwatu i desolwatu, chociaż ten drugi stał się bardziej drobnokrystaliczny (szersze refleksy PXRD). Ciekawe są też wyniki badań kompleksów gość (rozpuszczalnik) – gospodarz (POSS) dowodzące, że obecność gościa zwiększa dynamikę molekularną w obszarze klatek POSS. W tym przypadku Doktorant przeprowadził analizę parametru *span* tensora przesunięcia chemicznego krzemu-29 oraz wykonał pomiary 2D ^{29}Si i ^{13}C CODEX. Badania te są bardzo interesujące ze względu na możliwość inkorporacji do POSS różnych małych molekuł organicznych.

Podsumowując zalety merytoryczne recenzowanej pracy doktorskiej mgr. Tomasza Pawlaka podkreślam jej nowatorstwo metodyczne, bogactwo i dużą wagę informacji strukturalnych na temat badanych peptydów i polimerów oraz nowatorskie zastosowanie metody GIPAW chemii kwantowej, komplementarnie z szeregiem nowoczesnych sekwencji impulsowych ssNMR, wspartych w konkretnych przypadkach szybkim wirowaniem próbki z częstością 55 kHz (nowoczesny hardware ssNMR). Wysoki poziom publikacji odzwierciedla ich sumaryczny IF wynoszący około 22.

W pracy nie zauważyłem żadnych błędów lub spraw merytorycznych wymagających krytycznego komentarza. Poniższe uwagi mają na celu zwrócenie uwagi Doktoranta na pewne zagadnienia, które moim zdaniem wymagają szczególnej uwagi w tego typu badaniach:

1. Wydaje mi się, co należałoby potwierdzić analizą Scherrera dyfraktogramów PXRD lub badaniem TEM, że niektóre badane próbki musiały zawierać nanokryształy, czyli kryształy o przynajmniej jednym wymiarze poniżej 100 nm. W przypadku takich krystalicznych nanocząstek możemy mieć kilkanaście do kilkudziesięciu komórek elementarnych na dany wymiar nanocząstki, co sprawia że z pewnością bardzo zaburzona powierzchnia nanokryształu ma niebagatelny wpływ na porządek strukturalny w jego wnętrzu. Czyli może występować coś w rodzaju gradientu nieporządku strukturalnego, od dużego nieuporządkowania molekularnego w pobliżu powierzchni do coraz mniejszego w miarę postępu w głąb nanokryształu. Do tego dochodzi problem rozkładu (zmienności) wielkości kryształów i ewentualna solwatacja powierzchni, zwiększająca jej nieporządek strukturalny. Moja uwaga dotyczy więc wpływu wielkości nanokryształów na porządek molekularny sieci krystalicznej, jeśli mamy do czynienia z obiektami nanochemicznymi.

2. Trzeba brać pod uwagę, że rentgenowskie pomiary dyfraktometryczne są wykonywane zwykle w niskiej temperaturze (tutaj np. 100 K dla tripeptydów) a pomiary NMR-owskie w temperaturze próbki wewnątrz rotora (zwykle ok. 300 K). Wobec tego w krystalografii NMR trzeba uwzględniać różnice strukturalne związane z różnicami temperatury podczas pomiarów, zwłaszcza spowodowane przez przemiany fazowe (polimorficzne). Z tego też względu obliczenia GIPAW mające dążyć do zgodności z widmem ssNMR w rzeczywistości udokładniają strukturę od wersji niskotemperaturowej (startowe dyfraktometryczne parametry strukturalne do obliczeń) do wersji w temperaturze próbki w rotorze, czyli w zasadzie od struktury bardziej sztywnej do bardziej dynamicznej. Ponadto temperatura próbki wewnątrz rotora ssNMR rośnie wraz ze zwiększeniem szybkości wirowania, co przy braku właściwej kontroli temperatury (czy była tutaj stosowana ?) może w przypadku *fast MAS* prowadzić do zmian strukturalnych.

Podczas obrony doktoratu oczekuję porównania wyników własnych Doktoranta dotyczących α -PLLA z wynikami Chena, Reicherta i Miyoshi z 2015 roku (J. Phys. Chem. B **119**, 4552–4563), których już nie zdążył uwzględnić w rozprawie.

Przechodząc do oceny formalnej chciałbym podkreślić, że omówienie artykułów będących podstawą dysertacji jest zwarte, logiczne i rzetelnie przedstawiające najważniejsze zagadnienia. W obliczu mojej bardzo wysokiej oceny merytorycznej dysertacji, niestety muszę z przykrością zwrócić uwagę na liczne potknięcia edytorskie, zwłaszcza literówki i czasami niezręczne sformułowania. Na przykład, pierwsze zdanie rozprawy brzmi: „Przedstawiona dysertacja składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim”. Jeśli by tak było, to nie miałbym dużo pracy z recenzją. Natomiast w ważnym rozdziale „Cel pracy” dwa razy widzimy słowo „zawiązków”, zamiast „związków”. Nie ma sensu wymieniać wszystkich problemów edytorskich. Moje uwagi formalne przekażę Doktorantowi w bezpośredniej rozmowie. Do widm i tabel nie mam żadnych zastrzeżeń.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Tomasza Pawlaka stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na dużą ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną kandydata w zakresie spektroskopii NMR, chemii polimerów, krystalografii i chemii kwantowej. Doktorant jest rzetelnym, twórczym i samodzielnym badaczem, znającym dobrze zastosowane metody badawcze. Wyniki pracy doktorskiej mają niewątpliwy walor nowości naukowej oraz wytyczają nowe kierunki badań strukturalnych z zastosowaniem wysokorozdzielczej spektroskopii NMR w ciele stałym i wykorzystania obliczeń teoretycznych. Podkreślając wysoką jakość i nowoczesny charakter badań stwierdzam, że rozprawa mgr. Tomasza Pawlaka spełnia konieczne wymagania stawiane przez Ustawę rozprawom doktorskim. Zwracam się w związku z tym do Wysokiej Rady Naukowej CBMiM PAN z prośbą o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoki poziom merytoryczny badań proszę także o odpowiednie wyróżnienie pracy doktorskiej.

