



Instytut Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk

ul. M. Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznań
tel.: (61) 86-95-100, fax: (61) 86-84-524
Internet: <http://www.ifmpan.poznan.pl>

Prof. dr hab. Jadwiga Tritt-Goc

Poznań, 19 stycznia 2015

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana mgra Tomasza Pawlaka
pt. „Zastosowanie spektroskopii NMR w ciele stałym i metod obliczeniowych
w badaniach nieuporządkowania molekularnego
w kryształach peptydów i polimerów syntetycznych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgra Tomasza Pawlaka powstała pod kierownictwem naukowym Pana Profesora dr hab. Marka Potrzebowskiego w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Główną jej część stanowi spójny tematycznie zbiór 6 oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach z Listy Filadelfijskiej, takich jak: *Chemical Physics Letter* (publikacja nr 1), *Journal of Physical Chemistry B* (publikacja nr 2 i nr 5), *Physical Chemistry Chemical Physics* (publikacja nr 3), *CrystEngComm* (publikacja nr 4) i *Journal of Physical Chemistry C* (publikacja nr 6). Przygotowanie rozprawy doktorskiej w takiej formie dopuszczają przepisy *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki*. Publikacje poprzedzone są 66 - stronicowym wprowadzeniem, który można nazwać Autoreferatem, napisanym w języku polskim, na który składa się streszczenie w języku polskim i angielskim, wyjaśnienie motywacji i celu badań stanowiących przedmiot rozprawy, krótki opis metod badawczych i wyników badań wraz z ich podsumowaniem. W końcowej części rozprawy zostały załączone oświadczenia współautorów publikacji, spis publikacji i najważniejszych osiągnięć kandydata oraz cytowana literatura.

Dorobek naukowy mgra Tomasza Pawlaka jest imponujący. Poza pracami włączonymi do rozprawy doktorskiej jest on współautorem 19 artykułów w znaczących czasopismach z Listy Filadelfijskiej. Liczba cytowań, wszystkich jego 25 prac, bez autocytowań, wynosi około 120. Na podkreślenie zasługuje też aktywność Autora rozprawy w pozyskiwaniu grantów badawczych dla młodych naukowców. Kandydat jest dwukrotnym laureatem stypendium Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w latach 2015 i 2014, stypendium MNISW dla Wybitnych Młodych Naukowców w roku 2013, oraz licznych wyróżnień i nagród w okresie odbywania studiów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pan mgr Tomasz Pawlak z dużym powodzeniem prezentował wyniki swoich badań na międzynarodowych konferencjach, czego dowodem są zdobywane nagrody za wygłoszone referaty w roku 2011, 2012 i 2014. Odbył również kilka staży naukowo-badawczych w ośrodkach zagranicznych m. innymi w Japonii, Wielkiej Brytanii, Niemczech, Francji i w Republice Czeskiej.

Prace wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej ukazały się drukiem w latach 2012 – 2015, w renomowanych czasopismach o wysokich współczynnikach cytowań, sumaryczny IF = 21.24. Również wysoka jest punktacja tych czasopism zgodnie z aktualną punktacją MNISW: 3 prace w czasopiśmie za 35 punktów, 2 prace za 30 punktów i 1 praca za 25 punktów. Z uwagi na rangę czasopism można zakładać, że prace zostały już starannie zrecenzowane przez

szerokie grono zagranicznych recenzentów. Ich opublikowanie oznacza, że uzyskały pozytywną ocenę, co dodatkowo podnosi wartość rozprawy doktorskiej. Prace są jednak wieloautorskie: od dwóch do pięciu autorów. Nie budzi to żadnych moich zastrzeżeń, bowiem w fizyce doświadczalnej, a do takiej należy przede wszystkim recenzowana praca doktorska, artykuły drukowane w renomowanych czasopismach naukowych są najczęściej wieloautorskie. Jeżeli jednak takie prace tworzą rozprawę doktorską, to należy rozważyć wagę wkładu Doktoranta w powstanie artykułu. Mgr Tomasz Pawlak jest pierwszym autorem w pięciu publikacjach i drugim w jednej publikacji. Dokumentacja zawierająca oświadczenia 8 współautorów publikacji wchodzących w zakres pracy doktorskiej, o własnym wkładzie merytorycznym i procentowym udziale w przygotowanie publikacji, nie pozostawia wątpliwości, że jest on wiodącym współautorem tych publikacji i ma dominujący udział w wykonywaniu pomiarów widm NMR, ich interpretacji, obliczeń kwantowych oraz w opracowaniu wyników. Natomiast Autor, w przedmowie do rozprawy, wyraźnie podkreślił, że synteza i krystalizacja materiałów badawczych, których dotyczą publikacje oraz ich badania krystalograficzne i badania techniką PALS nie są jego autorstwa i nie są częścią jego pracy.

Przedmiotem badań recenzowanej rozprawy doktorskiej są wybrane układy modelowe: małowcząsteczkowe peptydy pochodzenia naturalnego i makrowcząsteczkowe polimery syntetyczne. Obie grupy materiałów charakteryzuje nieuporządkowanie molekularne. Pod tym pojęciem należy rozumieć procesy dynamiczne, ale również takie zjawiska, jak polimorfizm, solwatomorfizm, defekty strukturalne, czy zaburzenia sieci krystalicznej. Ogólnie występowanie tego typu zjawisk stanowi najczęstszą przyczynę dużej nieprecyzyjności wyznaczenia położeń atomów metodami krystalograficznymi określoną poprzez tzw. parametr „R-faktor”, który jest miarą zgodności danych uzyskanych w eksperymencie z modelem uzyskanym w trakcie procesu udokładniania struktury. **Poznanie i opis nieuporządkowania molekularnego stanowi istotny problem badawczy**, ważny zarówno z naukowego punktu widzenia, bo przyczyni się do rozwoju chemii strukturalnej, jak również z uwagi na zastosowanie praktyczne, bo umożliwi precyzyjniejszy opis układów ważnych biologicznie a także istotnych w chemii materiałowej, na poziomie molekularnym. Jest jednym z ważnych wyzwań współczesnej nauki. **Kandydat podjął się tego wyzwania**. Głównym celem jego rozprawy doktorskiej były badania doświadczalne i teoretyczne prowadzące do rozwoju metodologii badań nieuporządkowania molekularnego. Autor badał modelowe układy peptydów i syntetycznych polimerów w fazie stałej, metodami spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego i obliczeń kwantowo-mechanicznych. W szczególności zajmował się zaimplementowaniem metodologii GIPAW do badań związków tworzących uporządkowane i nieuporządkowane struktury krystaliczne, wdrożeniem nowych technik wysokorozdzielczej spektroskopii NMR w badaniach dynamiki molekularnej i analizie widm w ciele stałym, zastosowaniem Krystalografii NMR do analizy makrowcząsteczek polimerów oraz wykorzystaniem parametrów anizotropii przesunięcia chemicznego NMR do analizy nieuporządkowania molekularnego. Powiązanie badań doświadczalnych opartych o techniki NMR i pomiary dyfraktometryczne z obliczeniami teoretycznymi metodą GIPAW, która umożliwia uwzględnienie periodyczności sieci krystalicznej, to obecnie najlepsza metodologia rozwiązywania struktur krystalicznych. Publikacje Doktoranta stanowiące przedmiot rozprawy dotyczą idei rozwoju tej metody.

We wstępnych rozdziałach Autoreferatu Doktorant zwięźle scharakteryzował wykorzystane w badaniach metody wysokorozdzielczej spektroskopii NMR. Opisał również stosowane metody teoretyczne a także wyjaśnił, na czym polega metodologia zwana „Krystalografią NMR”. Stanowią one dobre wprowadzenie do znajdującego się dalej obszernego, zajmującego 39 stron, rozdziału zatytułowanego „Opis badań”. Autor dzieli opis

na badania dotyczące peptydów opioidowych oraz układów polimerów syntetycznych. Wśród pierwszej grupy bada tripeptydy Tyr-D-Ala-Phe i Tyr-L-Ala-Phe oraz tetrapeptyd Tyr-D-Ala-Phe-Gly. Peptydy ważne biologicznie. Ponadto, bada również meta i leu-enkefalinę (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met i Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Wymienione peptydy mogą występować w kilku formach krystalicznych o różnym stopniu uporządkowania. Z tego powodu, ich dane strukturalne zdeponowane w bazie krystalicznej nie są dokładne. Badania peptydów prowadzone przez Autora w fazie stałej wykonywane były wg następującego schematu: otrzymanie widm NMR, precyzyjny pomiar wartości przesunięć chemicznych, przypisanie sygnałów NMR odpowiednim atomom analizowanych struktur, analiza wpływu nieuporządkowania molekularnego lub związanego z dehydratacją (w zależności od badanych peptydów) na widma i parametry NMR oraz porównanie danych spektralnych z danymi uzyskanymi metodami obliczeń kwantowo-mechanicznych (metoda DFT, ONIOM i GIPAW). Ostatecznym efektem badań była udokładnienie danych strukturalnych uzyskanych metodami rentgenograficznymi. Autor wykazał, że parametr anizotropii przesunięcia chemicznego *span* najlepiej opisuje korelacje między doświadczalnymi i teoretycznymi parametrami NMR uzyskanymi dla danego układu badawczego. W przypadku idealnej korelacji ($\Omega_{eks} = \Omega_{obl.}$) wyniki doświadczalne i teoretyczne leżą na prostej o nachyleniu jeden, która przechodzi przez punkt początku układu współrzędnych. Dla tripeptydów Autor zaobserwował zawyżenie parametru *span* uzyskanego w drodze obliczeń teoretycznych w stosunku do obliczonego z eksperymentu NMR. Powiązał go z dynamiką molekularną i **zapropozował parametr *span*, jako kryterium analizy lokalnej dynamiki molekularnej. Jest to nowość dotychczas niespotykana w literaturze przedmiotu.** Kandydat wykazał istnienie lokalnej dynamiki molekularnej prowadzącej do obserwowanych rozbieżności między teoretycznymi a doświadczalnymi wartościami przesunięć chemicznych wykonując odpowiednie eksperymenty techniką NMR, czyli eksperyment 2D PILGRIM MAS oraz badania kształtu linii widm 2H NMR w funkcji temperatury. Pierwszy eksperyment pozwolił na pomiar heterojądrowych sprzężeń dipolowych i na podstawie ich wartości wyróżnienie statycznych i dynamicznych fragmentów (pierścieni) w badanych peptydach. Natomiast drugi eksperyment umożliwił wyznaczenie parametrów określających dynamikę pierścieni aromatycznych w funkcji temperatury.

W dalszej części badań poświęconych peptydom Kandydat zajął się badaniami tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly (YAFG). Głównym celem było ustalenie jego struktury po procesie dehydratacji. Autor wykorzystał w tym celu metodę Krystalografii NMR, w której widma eksperymentalne uzyskał z wykorzystaniem metody Very-Fast MAS NMR a teoretyczne z obliczeń metodą GIPAW. Korelacje przesunięć chemicznych protonów uzyskanych z obu rodzaju widm są bardzo silne ($R^2 > 0.97$) i zdecydowanie potwierdzają poprawność struktur krystalograficznych tetrapeptydu YAFG wodnego i bezwodnego zaproponowanych przez Autora. Warto podkreślić, że taka wartość R^2 nie jest często spotykana nawet przy analizie parametrów NMR układów ciekłych. Podziw może budzić niemal dokładne odwzorowanie widma eksperymentalnego, uzyskanego metodą $^1H-^{13}C/^{15}N$ 2D *inwers* HETCOR Very-Fast MAS NMR dla badanych tetrapeptów YAFG, poprzez odpowiednie widma uzyskane na podstawie obliczeń GIPAW i przy uwzględnieniu poszerzenia linii rezonansowych wynikających z eksperymentu. Fakt ten dodatkowo potwierdza słuszność zaproponowanych struktur molekularnych badanych tetrapeptów.

W badaniach peptydów meta i leu-enkefalin Autor rozprawy zajął się uściśleniem ich struktur krystalograficznych. Na podstawie danych strukturalnych zdeponowanych w bazie CCDC dla tych peptydów, Kandydat obliczył wartości przesunięć chemicznych i skorelował je z wynikami eksperymentalnymi uzyskanymi na podstawie widm ^{13}C CP MAS NMR tych związków. Wykazał, że dopiero pełna optymalizacja pozycji atomowych daje wysoki poziom zgodności obu wyników. Również w przypadku tych układów powiązał parametr *span*

z dynamiką molekularną. Na podstawie jednej z badanych struktur Autor wykazał, że pełna optymalizacja położeń atomowych metodą GIPAW pozwala uzyskać prawidłowy obraz tej struktury zgodny z własnościami badanego układu. Tym samym wykazał, że struktura zdeponowana w bazie krystalicznej, tego układu jest niepoprawna.

Dalszym przedmiotem badań przedstawionym w rozprawie doktorskiej są badania syntetycznego polimeru α -poli(L,L-laktydu) (α -PLLA) oraz układów polimerowych poliedrycznych silseskwioksanów. Polimer α -PLLA, z uwagi na biodegradowalność i biokompatybilność, znajduje liczne zastosowanie w medycynie. Może występować w kilku formach krystalicznych, które wpływają na własności fizyczne polimeru np. odporność termiczną, wytrzymałość mechaniczną, czy degradowalność. Metodą Krystalografii NMR (analiza widm uzyskanych metodami NMR: ^{13}C CP/MAS, ^{13}C 2D PASS 2D ^1H - ^{13}C PILGRIM MAS oraz obliczenia metodą GIPAW) Autor sprawdził poprawność danych strukturalnych α - PLLA przedstawionych w pracy Wasanasuk i inni z 2011r. Wykazał również, że metoda NMR jest bardzo czuła na nawet niewielkie zmiany konformacyjne molekuł, które mają bardzo duży wpływ na obraz widma węgla ^{13}C .

W badanych krzemoorganicznych usieciowanych polimerach Kandydat zajmował się analizą wolnych ruchów molekularnych i wpływem na nie oddziaływania typu gość-gospodarz, w których cząsteczkami gościa były cząsteczki chloroformu, octanu etylowego lub toluenu. Wykazał, że dzięki połączeniu zaawansowanych metod doświadczalnych NMR z obliczeniami metodą GIPAW można uzyskać porównywalne a nawet lepsze wyniki dotyczące struktur krystalograficznych badanych polimerów. Jest to wynik bardzo cenny i unikatowy w badaniu struktur układów makrocząsteczkowych. Wiadomo bowiem, że to właśnie wielkość badanej cząsteczki stanowiła poważne ograniczenie dla stosowania samej metody NMR do takich układów. **Zastosowanie z powodzeniem metody Krystalografii NMR w badaniach strukturalnych polimerów jest nowością w literaturze przedmiotu wprowadzoną przez Kandydata.**

Autoreferat mgra Tomasza Pawlaka jest dobrze przygotowanym przewodnikiem po publikacjach i znacząco ułatwia czytanie oryginalnych publikacji. Ta część własna rozprawy wskazuje na umiejętność krytycznego spojrzenia Doktoranta na uzyskiwane wyniki, jak również na dojrzałość naukową Kandydata polegającą na umiejętności dobrego zaplanowania i wykonania odpowiedniego eksperymentu NMR a potem poszukiwania nowych lub ulepszonych metod obliczeniowych w celu uzyskania wyników teoretycznych najlepiej korelujących z wynikami eksperymentalnymi. Autoreferat zawiera wiele rysunków i schematów ułatwiających analizę uzyskanych przez mgra Tomasza Pawlaka wyników. Ich omówienie jest przejrzyste, napisane poprawnym językiem i zrozumiale. Dołączona literatura jest dobrze dobrana, aktualna i obejmuje 45 pozycji literaturowych. W tej części rozprawy nie natrafiłam na poważniejsze błędy i niedociągnięcia poza drobnymi błędami edytorskimi, które zamieszczam poniżej.

- Str. 10, 11, 41 brak ujednolicenia w zapisie R-Factor , R-Faktor, R-factor
- Podpis pod wzorem (1), str.13, jest „*hamiltonian oddziaływania Zemana*” powinno być „*Zeemana*”
- Str. 16, 18, 20, Rysunek 3, 5, i 7 „*sekwencja plusowa*” chyba pulsowa lub impulsowa
- Str. 26, drugie zdanie pod rysunkiem 11 „*dokonałem tego na poprzez...*”
- Str. 26, ostatnie zdanie przed odnośnikiem do pozycji literaturowej [21]: niepotrzebny nawias na końcu skrótu ONIOM]
- Str. 32, trzecie zdanie nowego paragrafu: „*Badania tu przedstawione.....i stanowiły on w pewnym sensie*” winno być „*one*”
- Str. 32 podpis pod rysunkiem 17: „*...na podstawie pomiaru rendgenograficznego ...*” poprawnie „*rentgenograficznego*”

- Str.37, drugie zdanie od góry zamiast wyrazu „znaczarce” powinno być „znaczące”
- Str.37, podpis pod rysunkiem 23. Jest „z detekcja” powinno być „z detekcją”

Nie mam również zastrzeżeń merytorycznych związanych z metodyką pomiarową i warunkami prowadzenia doświadczeń. Analiza tekstu rozprawy wskazuje, że Doktorant doskonale opanował warsztat eksperymentalny związany z badaniami układów w fazie ciałostalowej techniką wysokorozdzielczej spektroskopii NMR i umiejętność prowadzenia obliczeń teoretycznych wybranymi metodami.

Omówione w Autoreferacie badania tripeptydów Tyr-D-Ala-Phe i Tyr-L-Ala-Phe stanowią przedmiot publikacji w *Chem Phys Lett* (publikacja nr 1) a tetrapeptydu Tyr-D-Ala-Phe-Gly w publikacji w *J. Phys. Chem B* (publikacja nr 2) oraz w *CrystEngComm* (publikacja nr 4). Wyniki badań peptydów meta i leu-enkefalin zostały przedstawione w pracy w *J. Phys. Chem. B* (publikacja nr 5). Natomiast Publikacja nr 3 w *PhysChemChemPhys* przedstawia wyniki badań syntetycznego polimeru α -poli(L,L-laktydu) a Publikacja nr 6 w *J. Phys. Chem. C* dotyczy badań układów poliedrycznych silseskwioksanów. Wszystkie prace zostały opublikowane, jak już zauważyłam na wstępie recenzji, w prestiżowych, zagranicznych czasopismach o wysokim IF a przedtem poddane wnikliwej ocenie recenzentów.

Lektura Autoreferatu oraz zbioru 6 spójnych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych pozwala mi stwierdzić, że cel rozprawy został zrealizowany. Rozprawa dotyczy spójnej tematyki, zawiera szeroki, poprawnie zinterpretowany materiał eksperymentalny uzupełniony o obliczenia teoretyczne a widma uzyskane metodą obliczeniową GIPAW bardzo dobrze korelują z widmami doświadczalnymi. Mgr Tomasz Pawlak wykazał się świetnym opanowaniem warsztatu eksperymentalnego i teoretycznego.

Podsumowując z przyjemnością stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska dokumentuje wysokie kompetencje jej Autora, mgra Tomasza Pawlaka, w dziedzinie wysokorozdzielczej spektroskopii NMR w ciałach stałych i kwantowo-chemicznych technik obliczeniowych oraz zawiera oryginalne i cenne wyniki naukowe. Nie mam wątpliwości, że rozprawa w pełni spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgra Tomasza Pawlaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej, zawarte w niej elementy nowości a także znaczący dorobek publikacyjny Doktoranta wnioskuję o jej wyróżnienie.

