



Warszawa, dnia 14 lutego 2025 r.

Dr hab. Beata Wielgus-Kutrowska, prof. UW
Tel. 22-55-32-339
e-mail: Beata.Wielgus-Kutrowska@fuw.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Baranowskiej
z Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki,
Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego
pt. „BADANIE ODDZIAŁYWAŃ POCHODNYCH BENZOESANU
METYLU I BIFENYLU Z WYBRANYMI ZŁOŻONYMI
MAKROcząSTECZKAMI CHEMICZNYMI I BIOLOGICZNYMI”**

Badania nad tworzeniem kompleksów inkluzyjnych, w których dynamiczna równowaga oddziaływań gospodarz-gość powstaje dzięki słabym oddziaływaniom niekowalencyjnym przeżywają obecnie dynamiczny rozwój. Wpisują się one w rozwój chemii supramolekularnej i mają zarówno walory poznawcze jak i aplikacyjne w różnych dziedzinach przemysłu i medycyny, gdzie związki gospodarza są wykorzystywane jako nośniki substancji aktywnych, a powstające kompleksy inkluzyjne pozwalają na kontrolowanie właściwości fizykochemicznych substancji bez konieczności zmiany ich struktury chemicznej. Kompleksy inkluzyjne umożliwiają zwiększenie rozpuszczalności leków o charakterze hydrofobowym, zwiększenia biodostępności substancji leczniczych, ochrony leków przed rozkładem, umożliwiają selektywną separację substancji, np. poprzez wychwytywanie wybranych cząsteczek. Ze względu na wzrastające zainteresowanie i znaczenie kompleksów inkluzyjnych istotne staje się wyjaśnienie procesów fotochemicznych i fotofizycznych prowadzących do ich tworzenia.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska magister Karoliny Baranowskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, w szczególności w aspekcie spektroskopowych badań oddziaływań gospodarz-gość, związanych ze zmianą właściwości gościa spowodowanych fotoindukowanym przeniesieniem ładunku, czy zrywaniem wiązań wodorowych między cząsteczką gościa, a cząsteczkami wody.

Praca została wykonana pod opieką dr hab. Marka Józefowicza, prof. UG w Zakładzie Fizyki Atomowej i Molekularnej Instytutu Fizyki Doświadczalnej Uniwersytetu Gdańskiego. Grupa badawcza, w której prowadzono badania, specjalizuje się w tego rodzaju zagadnieniach, co zapewniło wysoką jakość uzyskanych wyników.

Pod względem dorobku naukowego Doktorantka przedłożyła pięć publikacji w renomowanych czasopismach międzynarodowych, w których we wszystkich przypadkach, występuje jako pierwszy autor (w grupach liczących od dwóch do siedmiu autorów). Podkreśla to jej znaczący wkład w prowadzone badania. Prace zostały opublikowane w czasopismach o wysokim impact factor oraz ministerialnej punktacji od 100 do 140 (*Journal of Molecular Liquids* – 3 publikacje, *IJMS* – 1 publikacja, *Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* – 1). Ponadto Doktorantka prezentowała wyniki swoich badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Powyższy dorobek oceniam bardzo wysoko.

Głównym celem pracy magister Karoliny Baranowskiej było zbadanie za pomocą spektroskopii stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądowego oddziaływań pochodnej bifenylu i czterech pochodnych benzoesanu metylu z nośnikami supramolekularnymi. Wśród analizowanych nośników znalazły się α -, β - i γ -cyklodekstryny, kurkubit[7]uryly oraz rozpuszczalne w wodzie sulfonowe pochodne kaliks[6]arenów. Dodatkowo badania przeprowadzono dla makromolekuly biologicznej – albuminy wołowej. Wybór tych obiektów badawczych, ze względu na ich właściwości fotofizyczne i chemiczne, uważam za uzasadniony i niezwykle interesujący.

Prace można podzielić na dwie części. Pierwsza, licząca 57 stron, stanowi przewodnik po publikacjach będących podstawą rozprawy doktorskiej rozszerzony o wyniki, które nie znalazły się w opublikowanym materiale. Bibliografia obejmuje 84 pozycje. W drugiej części dołączono pięć wyżej wymienionych, opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Pierwsza część pracy jest napisana stosunkowo skrótowo, co wynika z faktu dołączenia publikacji. Niemniej jednak oczekiwałabym bardziej szczegółowego wyjaśnienia opisywanych zjawisk, zamiast ogólnych stwierdzeń, że dany proces lub zjawisko jest „w pełni zrozumiałe”. Dobrą praktyką jest także dołączanie spisu skrótów wraz z objaśnieniami, którego w pracy brakuje. Przydatny byłby również opis stosowanych metod badawczych i metod analizy danych eksperymentalnych.

Rozprawa rozpoczyna się od Wstępu, który uzasadnia podjęcie badań oraz przedstawia ich cele. Kolejne dwa Rozdziały zawierają prezentację badanych cząsteczek - podsumowanie właściwości wybranych związków makrocyklicznych i białka - albuminy wołowej, oraz charakterystykę pochodnych bifenylu i benzoesanu metylu pełniących rolę gościa w badanych układach. Rozdziały te stanowią wprowadzenie do tematyki rozprawy.

W pierwszym z wyżej wspomnianych Rozdziałów Autorka opisuje znaczenie i cechy kompleksów inkluzyjnych gospodarz-gość. Zwraca uwagę na fakt tworzenia odwracalnych kompleksów dzięki słabym oddziaływaniom elektrostatycznym, konieczność dopasowania geometrycznego i elektronowo-energetycznego gościa do hydrofobowej wnęki gospodarza. Następnie przedstawia charakterystykę badanych związków makrocyklicznych. Ostatnia część pierwszego Rozdziału poświęcona jest albuminie wołowej.

W Rozdziale drugim Autorka podsumowuje informacje dostępne w literaturze dotyczące badanych przez Nią cząsteczek organicznych o interesujących właściwościach spektroskopowych, pełniących rolę gości w kompleksach inkluzyjnych. Są to estry metylowe

kwasów: o-metoksy p-metyloaminobenzoowego (I), o-hydroksy p-metyloaminobenzoowego (II), o-metoksy p-dimetyloaminobenzoowego (III), o-hydroksy p-dimetyloaminobenzoowego (IV) (zgodnie z oznaczeniami Autorki dalej będą stosować zapis I, II, III, IV dla wymienionych związków) oraz dwuchromoforowa, donorowo-akceptorowa pochodna bifenyłu: 5-(4-aminofenilo)-3-dimetylamino-2,4-dicyjanobenzoesan etylu (EDMAADCy).

Kolejne Rozdziały 3, 4 i 5 są przewodnikami po publikacjach dołączonych do pracy doktorskiej.

Rozdział 3 obejmuje badania właściwości pochodnych benzoesanu metylu I - IV, ich oddziaływań z wybranymi nośnikami makrocyklicznymi i odwołuje się do publikacji oznaczonych jako A1, A2, A3.

Po scharakteryzowaniu właściwości spektroskopowych roztworów protycznych i aprotycznych związków I – IV przeanalizowano ich zdolność do tworzenia kompleksów inkluzyjnych w stanie podstawowym i wzbudzonym ze związkami makrocyklicznymi: α -, β - i γ -cyklodekstrynami, kurkubit[7]-uryłami i 4-sulfonowym kaliks[6]arenami. Dla wszystkich układów, które badała Autorka - z wyjątkiem α -cyklodekstryny z cząsteczkami I i II (pomiar oddziaływania III i IV z cyklodekstrynami znajdują się we wcześniejszych pracach) w stanie podstawowym - potwierdzono powstawanie kompleksów inkluzyjnych o różnej stabilności i stechiometrii.

W tym Rozdziale Autorka rozważa wpływ nośników makrocyklicznych na obserwowane zjawiska - emisję z różnych elektronowych stanów wzbudzonych molekuł I-IV takich jak: LE (Local Excited State) – obserwowany dla wszystkich badanych cząsteczek (I-IV), ESIPT (Excited State Intramolecular Proton Transfer) – charakterystyczny dla związków II i IV, TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer) – występujący w związkach III i IV, oraz promienistą dezaktywację kompleksów związanych i niezwiązanych wiązaniem wodorowym (I-IV). Analiza danych z pomiarów czasowo-rozdzielczych, przeprowadzona z wykorzystaniem modeli matematycznych pozwoliła na wyznaczenie stechiometrii kompleksów i stałych kompleksowania (asocjacji).

Porównując wyniki dla swobodnych cząsteczek po utworzeniu kompleksów: dla I obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji pasma LE; dla II charakterystyczny jest wzrost wydajności kwantowej emisji ze stanu ESIPT; dla III zwiększenie emisji ze stanu TICT pojawia się dopiero przy dużych stężeniach cyklodekstryn i kaliks[6]arenów; dla IV w obecności cyklodekstryn i kaliks[6]arenów obserwuje się istotny wzrost fluorescencji pasma LE i ESIPT przy jedynie nieznacznym wzroście emisji ze stanu TICT.

Uzyskane w pomiarach czasowo-rozdzielczych czasy życia fluorescencji są interpretowane jako wynikające z wygaszania cząsteczek związanych lub niezwiązanych wiązaniem wodorowym z cząsteczkami wody, emisji ze stanu ESIPT i TICT oraz ze stanu z częściowym przeniesieniem ładunku ICT. Pojawia się również czas życia interpretowany jako odpowiadający promienistej dezaktywacji cząsteczki w kompleksie 2:1.

Pomiary rozszerzono o dane NMR, które potwierdziły wyniki dotyczące stechiometrii i pozwoliły na utworzenie modelu wiązania cząsteczek przez makromolekuły cykliczne CB[7] i

SCA[6]. W tych przypadkach dla CB[7] dla kompleksów w stanie podstawowym i wzbudzonym mamy stechiometrię 1:1, a dla SCA[6] 1:1 dla związków I i II, a 2:1 dla III i IV.

Mam następujące pytania/uwagi do Rozdziału 3:

- Dlaczego kompleks inkluzyjny powstaje dla α -cyklodekstryny i związków I i II w stanie wzbudzonym, skoro brak oddziaływania w stanie podstawowym tłumaczony jest niedopasowaniem geometryczno-sferycznym? Jaskim zmianom ulega geometria układu, skoro dopasowanie staje się możliwe?
- Jak wyjaśnić różnice w stechiometrii kompleksów 1:1 i 2:1 dla I i II z β - i γ -cyklodekstrydami w stanie podstawowym 1:1, a w wzbudzonym 2:1?
- Jak zinterpretować czas życia τ_3 dla kompleksu I- γ -CD (Tab. 6), który pojawia się dla wysokich stężeń cyklodekstryny, a niewidoczny jest dla α -, β -cyklodekstryn?
- Metodologia wyznaczania stechiometrii kompleksów opiera się na klasycznych modelach Benesiego-Hildebranda, Nigama i Durochera oraz Joba. Autorka słusznie stosuje regresję nieliniową do korekty wyników uzyskanych metodą Benesiego-Hildebranda, jednak brak w pierwszej części pracy krytycznej analizy tych metod. Proszę o ich porównanie, omówienie założeń oraz ograniczeń.
- Czy równowaga między kompleksami 1:1 i 1:2 może zmieniać się w zależności od warunków eksperymentalnych, np. temperatury, pH lub siły jonowej roztworu i czy znany jest optymalny zakres warunków dla stabilności kompleksów?
- Czy rozważano badania kompleksowania w układach wieloskładnikowych, np. z obecnością innych cząsteczek biologicznie czynnych? – dałoby to odpowiedź na pytanie o aplikacyjną użyteczność badanych kompleksów.
- Warto byłoby także odnieść się do możliwości wpływu oddziaływań z tlenem cząsteczkowym na procesy wygaszania fluorescencji – aspekt ten wydaje się pominięty w rozprawie. Czy wykluczono te oddziaływania jako alternatywny mechanizm dla zaobserwowanych zmian fluorescencji?

Rozdział 4 (odpowiednia publikacja jest oznaczona jako A4) zawiera interesującą analizę oddziaływań dwuczłonowej donorowo-akceptorowej pochodnej bifenyli 5-(4-aminofenilo)-3-dimetyloamino-2,4-dicyjanobenzoesan etylu (EDMAADCy) z γ -cyklodekstryną wybraną do badań ze względu na pasujący do jej wnęki rozmiar cząsteczki gościa. Analizowany jest też wpływ środowiska na konformację cząsteczki.

Na podstawie badań spektroskopowych stacjonarnych i czasowo-rozdzielczych stwierdzono, że EDMAADCy może występować w różnych konformacjach, a wzrost jego stężenia prowadzi w DMSO do planaryzacji cząsteczki i zmiany jej właściwości fluorescencyjnych. γ -Cyklodekstryna selektywnie wiąże różne konformery EDMAADCy. przy czym stechiometria wiązania wynosi 1:1. Wartości stałych równowagowych zależą od długości fali światła wzbudzającego co świadczy o różnym rozkładzie konformerów. Stała asocjacji zależy od stężenia, co jest związane z tym, że dla dużych stężeń dominuje konformer wypłaszczony, dla którego jest większe prawdopodobieństwo wiązania z cyklodekstryną. Wątpliwości może budzić ograniczona rozpuszczalność EDMAADCy, która może prowadzić

do niejednorodności próbek i wpływać na dokładność pomiarów – temat ten nie został szerzej poruszony w rozprawie. Ponadto, warto byłoby odpowiedzieć na pytanie

- Czy obserwowane zmiany fluorescencji wynikają wyłącznie z efektu planaryzacji, czy też mogą być skutkiem agregacji lub innych oddziaływań międzycząsteczkowych?

Rozdział 5, poświęcony oddziaływaniom pochodnych benzoenu metylu I i II z albuminą surowicy wołowej, stanowi ważne rozszerzenie pracy w kierunku zastosowań biologicznych. Wyniki tych badań umieszczono w publikacji A5. Celem badań było zrozumienie mechanizmów tych interakcji, zwłaszcza roli reszty tryptofanu w BSA, stąd przed przystąpieniem do badania oddziaływania z białkiem zbadano fluorescencję mieszaniny zawierającej badane molekuly I, II i tryptofan.

Autorka ustaliła, że obie pochodne tworzą stabilne kompleksy o stechiometrii 1:1 z tryptofanem oraz z BSA w stanie podstawowym i wzbudzonym, a wygaszanie fluorescencji towarzyszące ich wiązaniu jest zgodne ze statycznym mechanizmem wygaszania. Cennym aspektem tej części pracy jest analiza wpływu oddziaływania gość-gospodarz na dynamikę solwatacji, co może dostarczać nowych informacji na temat mechanizmów wiązania. Analiza termodynamiczna przy użyciu relacji van't Hoffa pokazała, że proces wiązania jest spontaniczny, egzotermiczny i napędzany entalpią.

- Zasadne byłoby bardziej szczegółowe omówienie sposobu przeprowadzenia pomiarów w kontekście częściowego nakładania się widm pochodnych I i II z widmem BSA.
- Interesującą byłaby próba krystalizacji kompleksów I-BSA i II-BSA w celu jednoznacznego ustalenia miejsc ich wiązania na białku. Czy podjęto lub planowana jest taka próba?

Opis rozprawy kończy Podsumowanie, w którym mgr Karolina Baranowska zestawia najważniejsze wyniki i spostrzeżenia, powstałe w wyniku przeprowadzonych badań, oraz Bibliografia. Dalej znajdują się teksty opublikowanych prac, na które Autorka powołuje się w części pierwszej rozprawy.

Pod względem edytorskim i graficznym, praca doktorska mgr Karoliny Baranowskiej została przygotowana starannie. Choć sporadycznie (patrz poniżej) pojawiają się błędy interpunkcyjne i edytorskie, ich liczba jest niewielka i nie wpływa na ogólną ocenę pracy.

- Rozdział 1: zdanie „za absorpcję i fluorescencję białek odpowiedzialne są wcześniej wspomniane aminokwasy aromatyczne” jest nieściśle. Dotyczy to długości fali około 280 nm, jednak w zakresie 190–220 nm dodatkowo absorbują wiązania peptydowe w białkach.
- Rozdział 3: zamiast sformułowania „w niniejszym rozdziale zbadano” lepiej byłoby napisać „opisano wyniki badań”.
- Schematy związków na Rys. 3 (str. 17) należałoby ujednotwić. Dlaczego dla I mamy grupę $\text{H}_2\text{CO}-$, a nie $\text{CH}_3-\text{O}-$ jak dla III? Podobnie dla II występuje zapis $-\text{OCH}_3$, a dla III $-\text{O}-\text{CH}_3$.
- Str. 24 przesunięcie hipsochromowe, a nie hipsochoromowe
- ESIPT czy ESPIT. Błąd na stronach: 6, 31, 33.
- W tabeli 9, str. 37 pojawia się skrót związku SCX[6]. Rozumiem, że chodzi o SCA[6]?
- Str. 14, Rys. 2 – brak odnośnika do struktury albuminy, z której pochodzi rysunek,
- Użycie sformułowania „w pełni zrozumiałe” str. 23, 26, (wolałabym, aby to było wyjaśnione)
- Str. 27, Rys. 6 – brak informacji o długości fali wzbudzenia
- Str. 48 – konformerów, a nie konforemerów

Podsumowując, chociaż pierwsza część przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Baranowskiej, mogłaby być napisana bardziej szczegółowo, a niektóre aspekty metodologiczne i interpretacyjne mogłyby być szerszej omówione, nie umniejsza to jej wartości. Autorka wykazuje dużą znajomość metod spektroskopowych oraz zagadnień związanych z tworzeniem kompleksów inkluzyjnych. Przedstawione badania są istotne zarówno z perspektywy poznawczej, jak i aplikacyjnej, a ich wyniki te mogą być wykorzystane zarówno w badaniach fundamentalnych, jak i w projektowaniu nowych układów molekularnych opartych na kompleksach inkluzyjnych, np. w chemii supramolekularnej, przy konstruowaniu sensorów fluorescencyjnych czy nośników leków.

Materiał badawczy zawarty w rozprawie ma nowatorski charakter i wnosi istotny wkład w rozwój badań nad kompleksami inkluzyjnymi. Najważniejszym wynikiem rozprawy doktorskiej jest szczegółowa analiza mechanizmów tworzenia kompleksów inkluzyjnych pomiędzy badanymi cząsteczkami organicznymi a nośnikami makrocyclicznymi oraz ich wpływ na właściwości spektroskopowe cząsteczek gości. Do kluczowych osiągnięć pracy należą: określenie wpływu środowiska na strukturę i właściwości fluorescencyjne badanych układów oraz udowodnienie w niektórych przypadkach, różnej stechiometrii kompleksów w stanie podstawowym i wzbudzonym, co sugeruje istotne zmiany właściwości cząsteczek w wyniku wzbudzenia.

Przedstawiona rozprawa doktorska magister Karoliny Baranowskiej, przygotowana na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Gdańskiego, pt. „Badanie oddziaływań pochodnych benzoesanu metylu i bifenyłu z wybranymi złożonymi makrocząsteczkami chemicznymi i biologicznymi” stanowi wartościowy wkład w rozwój badań nad kompleksami inkluzyjnymi oraz spektroskopowymi aspektami oddziaływań gospodarz–gość. Jest nowatorska, oparta na solidnych podstawach eksperymentalnych i świadczy o wysokiej kompetencji autorki w zakresie badań spektroskopowych i chemii supramolekularnej. Udowadnia również jej umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, co potwierdzają publikacje w renomowanych czasopismach naukowych. Zgłoszone uwagi i zastrzeżenia nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia zarówno ustawowe (ustawa z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Karoliny Baranowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.