

# **AUTOREFERAT**

## **Opis dorobku i osiągnięć naukowych**

Załącznik 2

**Dr Daniel Michał Kamiński**

Katedra Chemii

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 15

Tel. 81 445 67 49

Email: [daniel\\_kaminski3@wp.pl](mailto:daniel_kaminski3@wp.pl)

Strona www: [www.kaminski.lublin.up.pl](http://www.kaminski.lublin.up.pl)

Lublin, 2015

*Kamiński*

## 1. Dane personalne

Imię i nazwisko: **Daniel Michał Kamiński**

Data urodzenia: **02.10.1975.**

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**02.07.2008** Doktor nauk chemicznych w zakresie chemii fizycznej, Solid State Chemistry na Radboud University in Nijmegen (Holandia), tytuł pracy: “The atomic-scale role of additives during crystal growth from solution -surface X-ray diffraction studies” (pol.: „Rola dodatków na poziomie atomowym w procesie wzrostu kryształów z roztworu – badania powierzchniowej dyfrakcji rentgenowskiej”), promotor Profesor Elias Vlieg, kopromotor dr Willem van Enkevort

**08.09.2000** Magister chemii, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie, tytuł pracy magisterskiej: „Rentgenowskie badania strukturalne pochodnych tetraazaanulenu”, promotor prof. dr hab. Krzysztof Woźniak

**1995** Technik, specjalność: „*Technologia procesów chemicznych nieorganicznych*”, Technikum Chemiczne Marii Curie Skłodowskiej w Kielcach,

## 3. Doświadczenie zawodowe

**od 04.2009** Wydział Żywności i Biotechnologii na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie, Katedra Chemii, Lublin, Polska, zatrudniony na stanowisku adiunkta

**08.2005-08.2008** Wydział Fizyki Eksperymentalnej i Stosowanej, Christian-Albrechts-Universität w Kilonii, Niemcy, staż post-doktorski

**02.2001-06.2005** Department of Solid State Chemistry, Radboud University in Nijmegen, Holandia, doktorant

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

***4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:***

**Organizacja molekularna wybranych związków  
biologicznie czynnych w kryształach i membranach  
lipidowych**

## 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

**H1. Kamiński D. M.**, *Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments*. European Biophysics Journal, **2014**, 43(10), p. 453-467 (open access).

**w artykule jestem autorem korespondującym**

**H2. Jarzemska, K.N.\***, **Kamiński, D. M.\***, Hoser, A.A., Malińska, M., Senczyna, B., Woźniak, K., Gagoś, M., *Controlled crystallization, structure, and molecular properties of iodoacetyl amphotericin B*. Crystal Growth and Design, **2012**, 12(5), p. 2336-2345

**\* autorzy mają równy wkład w powstanie pracy**

*Mój udział w tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, opracowaniu metody syntezy jodopochodnej amfoterycyny B, oczyszczeniu i krystalizacji tejże pochodnej, przeglądzie literatury, opracowaniu wyników dotyczących mechanizmu wzrostu kryształów i częściowo opisu struktury, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu z wykluczeniem części obliczeniowej, współredagowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz udziale w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Ze względu na rozbudowaną część obliczeniową w tej pracy mój udział procentowy oceniam na 40%.*

**H3. Gagoś M.**, **Kamiński D. M.**, Arczewska M., Krajnik B., Maćkowski S., *Spectroscopic Evidence for Self-Organization of N-Iodoacetyl amphotericin B in Crystalline and Amorphous Phases*. The Journal of Physical Chemistry B, **2012**, 116(42), p.12706-13.

*Mój udział w tej pracy polegał na krystalizacji i oczyszczeniu kryształów AmB-I, tworzeniu formy amorficznej, pomiarach FTIR bez opracowania wyników, współudziale w korelacji danych strukturalnych z efektami spektroskopowymi, udziale w pisaniu publikacji, przeglądzie literatury, współredagowaniu manuskryptu w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 21%.*

**H4. Kamiński D. M.**, Czernel G., Murphy B., Runge B., Magnussen O. & Gagoś M., *Effect of cholesterol and ergosterol on the antibiotic amphotericin B interactions with dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers: X-ray reflectivity study*. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, **2014**, 1838(11), p. 2947-2953

**w artykule jestem autorem korespondującym**

*Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, zaplanowaniu oraz przygotowaniu badań synchrotronowych jak również kierowaniu nimi, opracowaniu wyników i stworzeniu modelu opartego o dane dyfrakcyjne, korelacji danych z monowarstw z danymi dyfrakcyjnymi, przeglądzie literatury, pisaniu manuskryptu, współredagowaniu manuskryptu w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 60%.*

**H5. Kamiński D. M.,** Arczewska M., Pociecha D., Górecka E., Stępniewski A. i Gagoś M., *Amphotericin B-DPPC lipid complex: X-ray diffraction and FTIR studies.*

Journal of Molecular Structure, **2015**, 1080, p. 57-62

**w artykule jestem autorem korespondującym**

*Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, przygotowaniu próbek, opracowaniu danych eksperymentalnych a w szczególności korelacji danych dyfrakcyjnych z danymi spektroskopowymi, przeglądzie literatury, stworzeniu manuskryptu, współredagowaniu manuskryptu w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 80%.*

**H6. Kamiński D. M.,** Pociecha D., Górecka E. i Gagoś M., *The influence of amphotericin B on the molecular organization and structural properties of DPPC lipid membranes modified by sterols.* Journal of Molecular Structure, **2015**, 1082, p. 7-11

**w artykule jestem autorem korespondującym**

*Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, wbudowywaniu AmB do wielowarstw lipidowych, opracowaniu wszystkich danych eksperymentalnych, przeglądzie literatury, stworzeniu manuskryptu, współredagowaniu manuskryptu w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 80%.*

**H7. Kamiński D. M.,** Hoser A. A., Gagoś M., Matwiczuk A., Arczewska M., Niewiadomy A. & Woźniak K., *“Solvatomorphism of 2-(4-Fluorophenylamino)-5-2 (2,4-dihydroxybenzeno)-1,3,4-thiadiazole Chloride”*, Crystal Growth & Design, **2010**, 10 (8), p. 3410–3417

**w artykule jestem autorem korespondującym**

*Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, przeglądzie literatury, opracowaniu metody krystalizacji i kierowaniu tymi badaniami, przygotowaniu próbek, opracowaniu wyników z dyfrakcji strukturalnej z uwzględnieniem efektów solwatacyjnych, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, współredagowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz udział w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 60%.*

**H8. Hoser A. A.\*, Kamiński D. M.\*,** Matwiczuk A., Niewiadomy A., Gagoś M., Woźniak K., *“On polymorphism of 2-(4-fluorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxybenzeno)-1,3,4-thiadiazole (FABT)”* Cryst. Eng. Comm., **2013**, 15 (10), p. 1978-1988.

**\* autorzy mają równy wkład**

*Mój udział w tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, przeglądzie literatury, opracowaniu metody krystalizacji niejonowych form związku, opis polimorfizmu, współpracowaniu wyników badań rentgenowskich i obliczeniowych, napisaniu manuskryptu, współredagowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz udział w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 40%.*

**H9. Kamiński D.M.,** Matwijczuk A., Pocięcha D., Górecka E., Niewiadomy A., Dmowska M., Gagoś M., *Effect of 2-(4-fluorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole on the molecular organisation and structural properties of the DPPC lipid multibilayers.* Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, **2012**, 1818 (11), pp. 2850-2859

*Mój udział w tej pracy polegał na stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, przeglądzie literatury, kierowaniu pracami związanymi z krystalizacją oraz opracowanie metody krystalizacji tego związku, uczestniczeniu w pomiarach FTIR, opracowaniu wyników badań strukturalnych w tym solwatomorfizmu, napisaniu manuskryptu, współredagowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz udział w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 80%.*

**H10. Arczewska M.\*, Kaminski D. M.\*,** Górecka E., Pocięcha D., Rój E., Sławinska-Brych A., Gagos M., *“The molecular organization of prenylated flavonoid Xanthohumol in DPPC multibilayers: X-ray diffraction and FTIR spectroscopic studies”*, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, **2012**, 1828(2), p.213-22  
**\* autorzy mają równy wkład**

*Mój udział w tej pracy polegał na współudziale w stworzeniu jej zarysu koncepcyjnego, przeglądzie literatury, przygotowaniu próbek, uczestniczeniu w pomiarach FTIR, opracowaniu wyników badań rentgenowskich i częściowo FTIR, napisaniu części manuskryptu odnoszącej się do badań rentgenowskich i współtworzeniu części odnoszącej się do badań spektroskopowych, korelacji wyników spektroskopowych z dyfrakcyjnymi, współredagowaniu końcowej wersji manuskryptu oraz udziale w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Mój udział procentowy oceniam na 40%.*

**Oświadczenia współautorów prac, określające szczegółowo ich indywidualny wkład w powstanie publikacji znajdują się w załączniku nr 6.**

**Łącznie:**

- Sumaryczny impact factor za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według Journal Citation Report (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: 32,566
- Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego według wykazu czasopism naukowych MNiSW z roku publikacji: **307**

### **4.3. Działalność naukowo-badawcza**

Zgodnie z załącznikiem do Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 8 sierpnia 2011r. w sprawie obszarów wiedzy, dziedzin nauki i sztuki oraz dyscyplin naukowych i artystycznych mój kierunek badań naukowych dotyczy chemii fizycznej, która pozostaje w dziedzinie nauk chemicznych, w obszarze nauk przyrodniczych.

W swojej pracy badawczej koncentruję się głównie na zjawiskach fizykochemicznych powierzchni i interfejsu modelowych układów błonowych i kryształów; oddziaływaniach wewnątrzkrystalicznych, wzroście kryształów, polimorfizmie i solwatomorfizmie. W tym celu wykorzystuję różne techniki dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, analizę termiczną DSC oraz metody obliczeniowe. Współpraca z prof. dr hab. Mariuszem Gagosiem pozwoliła mi rozszerzyć moje możliwości badawcze o techniki spektroskopowe. Głównym nurtem badawczym w grupie Profesora są bowiem badania organizacji molekularnej związków biologicznie czynnych w odniesieniu do układów o znaczeniu biologicznym. W związku z powyższym postanowiłem wykorzystać swoją wiedzę w tej dziedzinie i rozszerzyć możliwości poznawcze zespołu o techniki dyfrakcyjne i krystalizację. W swojej pracy zajmuję się w dalszym ciągu krystalizacją oraz badaniem modelowych układów biologicznych, przez które rozumiem mono-, dwu- i wielowarstwy lipidowe modyfikowane sterolami. Układy te w uproszczeniu pozwalają badać oddziaływania związków biologicznie czynnych z błonami lipidowymi. Takie specyficzne interakcje molekuł z błoną lipidową można ekstrapolować do rzeczywistych układów biologicznych (modyfikacja błony, transport przez błonę). Przedstawione przeze mnie badania amfoterycyny B, 1,3,4-tiadiazoli oraz ksantohumolu a zwłaszcza: ich krystalizacji, organizacji molekularnej w błonach lipidowych oraz korelacji z technikami spektroskopowymi, znacząco uzupełniają prowadzone obecnie badania nad ich aktywnością biologiczną.

## 4.4. Przebieg rozwoju zawodowego

Od najmłodszych lat fascynowała mnie chemia, świat minerałów i procesy ich powstawania. Kierując się tymi pobudkami w 1990 roku rozpocząłem naukę w Technikum Chemicznym im. Marii Curie-Skłodowskiej w Kielcach, gdzie otrzymałem dyplom „Technik Procesów Chemicznych Nieorganicznych”. Po ukończeniu szkoły w 1995 roku podjąłem studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Na czwartym roku studiów zostałem przyjęty do Pracowni Krystalochemii Profesora Krzysztofa Woźniaka, gdzie mogłem rozwijać swoje zainteresowania i zgłębiać wiedzę związaną z budową kryształów i technikami dyfrakcji rentgenowskiej. Na piątym roku studiów wyjechałem, w ramach programu „Sokrates Erasmus”, do Holandii na Radboud University w Nijmegen do grupy Profesora Eliasa Vliega. Jest to jedna z czołowych grup na świecie zajmująca się fizykochemią i modelowaniem wzrostu kryształów. W grupie tej pod kierunkiem dr Willema van Enkevort i jego doktoranta Franka Hollendera zgłębiałem wiedzę dotyczącą wzrostu kryształów i towarzyszących im procesów powierzchniowych. Z tego okresu pochodzi moja pierwsza publikacja **P1**, dotycząca badań kryształów estrów kwasów tłuszczowych. Zrozumienie procesów powierzchniowych w przypadku wzrostu kryształów jest kluczowe, ponieważ zachodzą one zawsze na powierzchni. Stąd wynika moje bezpośrednie zainteresowanie zjawiskami międzyfazowymi, powierzchnią ciał stałych i technikami dyfrakcyjnymi, które w naturalny sposób umożliwiają takie badania.

### 4.4.1. Okres studiów doktoranckich

W 2000 roku obroniłem pracę magisterską pt. „Rentgenowskie badania strukturalne pochodnych tetraazaanulenu” pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka opartą na pięciu zmierzonych i rozwiązanych przeze mnie strukturach, przedstawionych w pracy **P2**. W tym też roku otrzymałem tytuł magistra chemii. Cztery miesiące później, na zaproszenie Profesora Vlieg’a - Radboud University w Nijmegen - rozpocząłem pracę w jego zespole. Profesor Elias Vlieg był moim bezpośrednim opiekunem naukowym. Na rozwój moich zainteresowań miały również wpływ cotygodniowe seminaria grupowe, w których często brał udział prof. dr Pieter Bennema (były kierownik grupy Solid State Chemistry - Radboud University w Nijmegen). Pracę doktorską pt. „The atomic-scale role of additives during crystal growth from solution – surface X-ray diffraction studies” napisałem pod kierunkiem



prof. Eliasa Vlieg'a na Radboud University w Nijmegen (Holandia). W tym czasie zajmowałem się badaniem powierzchni kryształów w ultra wysokiej próżni i w roztworach za pomocą rentgenowskiej dyfrakcji powierzchniowej, mikroskopii sił atomowych (AFM), elektronowych technik dyfrakcyjnych Reflectivity High Energy Electron Diffraction (RHEED), Low Energy Elektron Diffraction (LEED) i mikroskopii optycznej. Techniki te były bardzo pomocne w stworzeniu diagramu fazowego dla układu monowarstwy bizmutu na powierzchni Cu(111), praca **P10**. Dzięki tym badaniom udało mi się odkryć uporządkowanie powierzchni Bi-Cu(111) nie heksagonalne a romboedryczne. Układ ten jest wyjątkowy, gdyż praktycznie wszystkie ciekłe struktury powierzchniowe to układy o uporządkowaniu heksagonalnym. Ta unikalna struktura została opisana w pracy **P13**. W dalszej części studiów doktoranckich zajmowałem się wpływem pH na interfejs kryształ-roztwór a przez to na morfologię kryształów  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (KDP). Kryształy te odgrywają istotną rolę w technikach laserowych, głównie jako generatory wyższych harmonicznych, czego przykładem jest National Ignition Facility. Rezultatem tych badań było wyjaśnienie prawie stuletniej tajemnicy związanej z morfologią tych kryształów w zależności od pH środowiska, w jakim wzrastają, prace **P8**, **P11**. Kolejnym tematem którym zajmowałem się podczas studiów doktoranckich była morfologia kryształów NaCl. Kryształy te powstające w środowisku wodnym mają geometrię kubiczną, jednakże dodatek formamidu powoduje stabilizację rodziny powierzchni  $\{111\}$ , co oznacza, że powierzchnie te są zakończone na warstwie  $\text{Na}^+$  albo  $\text{Cl}^-$ . Taka konfiguracja wydaje się mało prawdopodobna, ponieważ prowadziłaby do układu termodynamicznie niestabilnego. W tym przypadku badania rentgenowskiej dyfrakcji powierzchniowej które wykonałem wykazały, że powierzchnia ta jest atomowo gładka i niezrekonstruowana, natomiast interfejs (kryształ-roztwór) jest zbudowany z naprzemiennych wodnych warstw zawierających  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  o stopniowym zaniku obu jonów. Model ten potwierdziły obliczenia teoretyczne rozkładu ładunku w poszczególnych warstwach. Wyniki powyższych prac są zawarte w mojej rozprawie doktorskiej, w pracy przeglądowej **P14**, w monografii **M1**, jak również były prezentowane na konferencjach.

Oprócz pracy badawczej do moich obowiązków w tym okresie należało rozwijanie oprogramowania ANA-ROD. Moim osiągnięciem w tym przypadku było zaimplementowanie zaawansowanego algorytmu globalnej optymalizacji VFSR (wykorzystywanego m.in. w armii amerykańskiej) w programie ROD, co znacząco poprawiło pracę programu i pozwoliło na szybsze i dokładniejsze dopasowywanie modelu do danych strukturalnych.

Przed zakończeniem mojego kontraktu z Radboud University, prof. dr Elias Vlieg

nawiązał współpracę z grupą prof. dr Polsemy z Uniwersytetu w Twente (Holandia), co zapoczątkowało badania modelowego układu bizmutu na powierzchni miedzi z zastosowaniem techniki LEM (Low Energy Elektron Microscopy). Efektem tej współpracy jest ciąg publikacji **P17**, **P23** i **P29** (nie będące częścią dorobku przedstawionego w pracy doktorskiej), które były kontynuacją wcześniejszych prac przedstawionych w mojej rozprawie doktorskiej **P10** i **P13**.

Znaczna część badań naukowych w tym okresie dotyczyła dyfrakcji powierzchniowej, przez co często wyjeżdżałem do synchrotronu ESRF w Grenoble (Francja). Praca w takich ośrodkach jest wyjątkowo wyczerpująca, ponieważ ze względu na wysoki koszt wykonania pomiarów, badania trwają nieprzerwanie aż do zakończenia eksperymentu. Na ostatnim roku studiów doktoranckich często sam kierowałem eksperymentami synchrotronowymi w ESRF.

#### **4.4.2. Staż post-doktorski**

Po zakończeniu pracy na Radboud University, ale jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora wziąłem udział w konkursie na pełnoetatowe stanowisko naukowe na Wydziale Fizyki Eksperymentalnej i Stosowanej Christian-Albrechts-Universität w Kilonii (Niemcy). Po kilkuetapowej rekrutacji i pomimo silnej konkurencji - uzyskałem tę posadę. Pracę w grupie Profesora Olafa Magnussena na Wydziale Fizyki Eksperymentalnej i Stosowanej na Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Niemcy) rozpocząłem w sierpniu 2005 roku. W czasie jej trwania zajmowałem się głównie wzrostem kryształów metali szlachetnych w środowisku elektrochemicznym oraz wpływem dodatków organicznych na proces ich wzrostu, przygotowywaniem powierzchni kryształów metali szlachetnych do badań (polerowanie, elektropolerowanie, sputtering) i ich charakterystyką w warunkach elektrochemicznych z zastosowaniem dyfrakcji powierzchniowej. Badania elektrochemiczne w tym przypadku odgrywają istotną rolę, gdyż pozwalają na kontrolę potencjału roztwór-elektroda, co jest dodatkowym parametrem obok temperatury czy składu roztworu pozwalającym wpływać bezpośrednio i odwracalnie na zjawiska fizykochemiczne zachodzące na powierzchni metalu.

Dodatkowo opracowałem aparaturę i metodę oczyszczania powierzchni platyny za pomocą płomienia palnika wodorowego i chłodzenia kryształu w atmosferze helu i wodoru oraz zaprojektowałem elementy głowicy w aparacie do sputteringu, którą wykorzystywałem w eksperymentach tam prowadzonych. W badaniach wzrostu kryształów metali z roztworów

kluczowa jest znajomość technik elektrochemicznych, z tego względu prof. dr hab. Olaf Magnussen skierował mnie do grupy Profesora Huana Feliu z Uniwersytetu w Alicante (Hiszpania) na szkolenie z elektrochemii. Wiedzę wyniesioną z tego szkolenia wykorzystywałem w badaniach elektrochemicznego wzrostu kryształów metali szlachetnych.

Na szczególną uwagę z okresu pracy w Niemczech zasługują dwie prace **P15** i **P19**. W pracy **P15** byłem pomysłodawcą i głównym wykonawcą. Wykorzystując całkowitą odwracalność elektrochemicznych procesów powierzchniowych pokazałem, że możliwe jest odtworzenie sekunda po sekundzie zmian strukturalnych zachodzących na powierzchni kryształu złota podczas jego wzrostu. Możliwe to było poprzez cykliczne powtarzanie sekwencji zmian potencjału przy równoczesnym zapisywaniu intensywności promieniowania rentgenowskiego dla różnych pozycji wiązki odbitej. Otrzymane dane wymodelowałem za pomocą swojej modyfikacji kodu programu ROD. Natomiast w pracy **P19** odkryłem, że ustawienie potencjału układu w przeciwnym kierunku niż planowany doprowadza do ważnego efektu „layer by layer dissolution”, który charakteryzuje się cyklicznymi zmianami w prądzie oraz w obrazie dyfrakcyjnym. Proces ten jest całkowicie symetryczny w stosunku do „layer by layer growth” obserwowanym dla tego układu. Zafascynowany zjawiskiem stworzyłem model matematyczny, który opisywał równocześnie efekty elektrochemiczne i dyfrakcyjne. Na podstawie tego modelu stworzyłem makro w programie Origin, które pozwoliło dopasować model równocześnie do danych dyfrakcyjnych i elektrochemicznych. Ostatecznie po niewielkiej zmianie dokonanej przez dr Klausa Kruga, polegającej na arbitralnym dopasowaniu czasu rozpuszczania kolejnych warstw, model ten został wraz z danymi eksperymentalnymi przedstawiony w publikacji, której jestem drugim autorem. Natomiast pomysł i rezultaty pracy **P19** stały się inspiracją dla grupy Profesora Magnussena do kolejnych badań.

Również miałem znaczący wkład w powstanie pracy **P22**. Podczas jednego z wyjazdów zauważyłem, że sygnał dyfrakcyjny z powierzchni miedzi pokrytej chlorkami jest zaskakująco dobry. Przekonałem więc zespół, aby poświęcić czas eksperymentalny na pomiary atomowej struktury powierzchni. W efekcie tego dysponowałem dużym zbiorem danych, który umożliwił mi stworzenie dokładnego modelu tego układu. Dane te oraz mój model zostały przedstawione w tej pracy i stały się punktem odniesienia do obliczeń kwantowych również w niej zawartych.

Podobnie jak powyżej, również w pracy **P19** przekonałem grupę, aby rozszerzyć badania o część strukturalną. Dzięki temu mogłem wymodelować pierwszą z trzech struktur bizmutu

na powierzchni złota (100). Pozostałe dwie struktury były scharakteryzowane na podstawie małej ilości refleksów, co pozwoliło jedynie na jakościowy opis geometrii mierzonych układów. Na podstawie opracowanych danych stworzyłem prezentowane w pracy modele struktur oraz ich opisy.

Brałem też udział w badaniach powierzchniowych substancji organicznych naniesionych na powierzchnię złota „self-assembled monolayers” - praca **P16**. W tym przypadku mój udział polegał na planowaniu i przeprowadzeniu badań dyfrakcyjnych w synchrotronie w DESY (Niemcy) a potem modelowaniu danych eksperymentalnych i przedstawieniu modelu, który je opisywał. Podobne badania przeprowadzałem jeszcze do doktoratu.

Z okresu pracy w Niemczech pochodzą artykuły **P15**, **P16**, **P19**, **P20**, **P22**, których wyniki były prezentowane na wielu konferencjach. Szczególnym wyróżnieniem za moje badania w tym okresie było dla mnie zaproszenie na Wydział Fizyki Uniwersytetu w Bonn, gdzie wygłosiłem wykład, na którym zaprezentowałem przebieg moich badań oraz osiągnięte wyniki.

#### ***4.4.3. Okres pracy na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie***

W lipcu 2008 roku uzyskałem stopień doktora, a miesiąc później zakończyłem pracę w Niemczech i z powodów rodzinnych wróciłem do Polski. W marcu 2009 roku podjąłem pracę na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie w grupie Profesora Andrzeja Niewiadomego, który zainteresował mnie swoimi badaniami nad związkami z grupy 1,3,4-tiadiazoli. W tym czasie budowa tych związków znana była jedynie w oparciu o badania spektroskopowe (NMR) oraz spektrometrię mas. Dokładna budowa tych związków w oparciu o dyfrakcję rentgenowską nie była dostępna. Wcześniejsze próby krystalizacji tych związków w innych grupach kończyły się niepowodzeniem. Problem ich krystalizacji potraktowałem jako wyzwanie i pomimo bardzo skromnych środków finansowych, już po półrocznej pracy dysponowałem kryształami form jonowych jednego z 1,3,4-tiadiazoli (praca **H7**). Kolejne pół roku prób doprowadziło mnie do opracowania ogólnej metody krystalizacji tej grupy związków w formie molekularnej z roztworów DMSO, czego efektem jest praca **H8**. Okres ten był również początkiem mojej współpracy z Profesorem Mariuszem Gagosiem, który wprowadził mnie w wiele tajników technik spektroskopowych jak również w problematykę badań biofizycznych. To właśnie on zainteresował mnie tematyką amfoterycyny B oraz ksantohumolu, czego efektem są prace **H 1-7** oraz **H10**.

Od wielu lat zajmuję się również tworzeniem oprogramowania edukacyjnego na różne platformy Microsoft Windows, które wzbudzało i wzbudza duże zainteresowanie wśród użytkowników. Było to dla mnie punktem wyjścia do stworzenia nowego programu WinRod do dyfrakcji powierzchniowej z intuicyjnym graficznym interfejsem użytkownika GUI. Jest to duży przełom w szybkości działania i intuicyjności interfejsu gdyż do tej pory dostępne oprogramowanie – głównie pakiet ANA-ROD lub skrypty działały z wiersza poleceń wykorzystując jeden wątek procesora, a ich interfejs użytkownika był mało intuicyjny, przez co dostępny tylko dla wąskiego grona specjalistów. W chwili obecnej program WinRod jest w pełni funkcjonalny. WinRod jest aplikacją wykorzystującą interfejs GUI, DirectX do tworzenia zaawansowanej grafiki 3D oraz wiele nowoczesnych rozwiązań informatycznych, jak wielowątkowość czy wykorzystanie poleceń procesora AVX. W programie tym zaimplementowałem również swoje rozwiązania związane z obliczeniami chropowatości powierzchni, wyznaczania położenia refleksów braggowskich w oparciu o zmianę fazy dla kryształu bazowego oraz rozproszenia anomalnego. Praca nad tym projektem zajęła mi dwa lata a program zbudowany jest z około 100000 linii kodu. Projekt ten rozwijam obecnie razem ze specjalistami z ESRF (dr Nikolay Vinogradov, Reiner Wilcke, Claudio Ferraro – kierownik ośrodka informatycznego ESRF) i DESY (dr Bridget Murphy i jej studenci). Do projektu przyłączył się również twórca programu ROD prof. dr Elias Vlieg. Wersja beta programu WinRod wzbudziła duże zainteresowanie wśród specjalistów, dzięki czemu zostałem zaproszony do ESRF na jego prezentację, jak również na konsultacje dotyczące dalszych trendów i rozwoju oprogramowania do rentgenowskiej dyfrakcji powierzchniowej wykorzystywanej w synchrotronach. Obecnie trwają prace nad nową wersją programu AVE do redukcji danych rentgenowskich w którym implementuję nowoczesny interfejs GUI dla systemów Windows. Oficjalny link do programu WinRod znajduje się na stronie ESRF: [http://www.esrf.eu/computing/scientific/joint\\_projects/ANA-ROD/](http://www.esrf.eu/computing/scientific/joint_projects/ANA-ROD/).

#### ***4.4.4. Cykl badań przedstawiony jako osiągnięcie naukowe***

Celem prezentowanych w autoreferacie prac były badania organizacji molekularnej wybranych związków o znaczeniu biologicznym w kryształach oraz w mono- i wielowarstwach lipidowych modyfikowanych sterolami (cholesterol i ergosterol). W badaniach tych zastosowałem techniki: warstw jednocząsteczkowych, dyfrakcji rentgenowskiej z granicy ciecz-gaz, dyfrakcji rentgenowskiej szerokokątowej, dyfrakcji

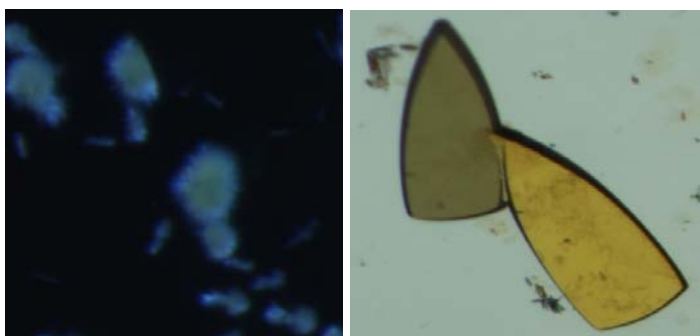
strukturalnej z kryształów, mikroskopii fluorescencyjnej oraz spektroskopii w podczerwieni ATR-FTIR.

## **Amfoterycyna B**

Moja problematyka badawcza koncentruje się głównie na organizacji molekularnej wybranych związków organicznych w kryształach i w modelowych układach biologicznych. Z tego powodu szczególnie zainteresował mnie badany w grupie prof. dr hab. Mariusza Gagosa błonowy antybiotyk przeciwgrzybiczny amfoterycyna B (AmB). AmB jest makrolidowym, jonoforowym antybiotykiem z grup polienów, powszechnie wykorzystywanym w medycynie podczas ciężkich grzybic wewnątrzustrojowych. AmB jest również stosowana prewencyjnie po przeszczepach narządów wewnętrznych, transplantacji szpiku, w terapii chorób nowotworowych i AIDS. AmB pomimo jej znaczenia w medycynie jest ciągle jednym z najbardziej toksycznych leków. Uważa się, że jej działanie polega na tworzeniu porów molekularnych odpowiedzialnych za wyciek z komórek ważnych życiowo jonów i substancji, co w konsekwencji prowadzi do ich śmierci. Większą toksyczność AmB wobec komórek grzybów, niż wobec komórek ssaków tłumaczy się wyższym powinowactwem AmB do ergosterolu, który jest składnikiem błon komórkowych grzybów. Nie jest to jednak jedyny mechanizm wyjaśniający działanie tego leku.

Po nawiązaniu współpracy z Profesorem i przedstawieniu swoich możliwości badawczych związanych z krystalizacją oraz dyfrakcją rentgenowską, zostałem zaproszony przez Profesora do projektu badawczego *"Znaczenie jonów metali, ziem alkalicznych i przejściowych w procesie agregacji amfoterycyny B w modelowych układach biologicznych"*, nr grantu N N401 015035. Logicznym następstwem przystąpienia do projektu były próby krystalizacji amfoterycyny B. Niestety antybiotyk bez właściwego oczyszczenia i bez modyfikacji chemicznych nie krystalizuje. Wielokrotne próby jego krystalizacji doprowadziły ostatecznie do wytworzenia kryształów AmB w postaci sferolitów o rozmiarach  $\sim 10 \mu\text{m}$  (Rys. 1). Charakterystyczny, szablony kształt kryształów wskazywał na duży wpływ śladowych zanieczyszczeń i prawdopodobnie też rozpuszczalnika na przebieg ich wzrostu. W związku z tym podjąłem się opracowania syntezy, oczyszczania i krystalizacji jodoacetylowej pochodnej amfoterycyny B (AmB-I) w oparciu o pracę Ganisa [1]. Szybko jednak okazało się, że informacje w niej zawarte są dalece niewystarczające do odtworzenia eksperymentu. Na podstawie około setki syntez i krystalizacji udało mi się opracować metodę krystalizacji, która

pozwoliła mi otrzymać wysokiej jakości kryształy AmB-I. Dużym utrudnieniem na tym etapie badań były małe ilości związku używane w eksperymentach, co było podyktowane jego wysoką ceną. W pracy tej bardzo pomocne były badania chromatograficzne wykonane przez mgr Bogusława Senczynę (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) w celu oznaczenia ilościowego zanieczyszczeń poreakcyjnych. Na podstawie zebranych danych mogłem stworzyć kompletny morfogram (morphodrome) dla układu AmB/AmB-I, w którym czysta amfoterycyna B była modyfikatorem wzrostu kryształów AmB-I. Charakterystyczny kształt kryształów AmB-I (Rys. 1.) stał się dla mnie inspiracją do studium ich mechanizmu wzrostu z roztworu. Ostatecznie w pracy przedstawiłem kompletny mechanizm wyjaśniający kształt i efekty zachodzące na powierzchni kryształów AmB-I, gdzie szczególną rolę odgrywa obecność AmB.



**Rys. 1.** Po lewej, kryształy AmB które są w formie sferolitów o bardzo ostro zakończonych krawędziach ( $10 \times 5 \times 2 \mu\text{m}$ ). Świadczy to o dużym wpływie śladowych zanieczyszczeń na proces ich wzrostu, co z kolei tłumaczy trudności w otrzymaniu kryształów o większych rozmiarach (0.5 mm). Po prawej, fotografia kryształów AmB-I ( $0.7 \times 0.3 \times 0.1 \text{mm}$ ). Na uwagę zasługuje bardzo charakterystyczny żelazkowy kształt kryształów.

Wysokiej jakości kryształy AmB-I, o znacząco zredukowanej długości, otrzymane moją metodą zostały zmierzone w grupie prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka. Efektem tego były dane strukturalne wielokrotnie dokładniejsze od tych przedstawionych w pracy Ganisa z 1972 roku. Niewielkie rozmiary grupy jodoacetylowej w porównaniu do cząsteczki AmB i duże podobieństwo dyfraktogramu proszkowego AmB do tego wygenerowanego z danych strukturalnych AmB-I wskazywały na duże podobieństwo struktur AmB i AmB-I. Z tego powodu zasugerowałem, aby policzyć strukturę hipotetycznych kryształów AmB w oparciu o dane dyfrakcyjne z AmB-I. Zadania tego podjęła się Pani dr Katarzyna Jarzębska. A rezultaty tego przedsięwzięcia pozwoliły wyjaśnić trudności w krystalizacji AmB. Artykuł **H2** został bardzo wysoko oceniony przez trzech recenzentów w *Crystal Growth and Design*.

Dostępność kryształów AmB-I dała nowe możliwości w badaniach spektroskopowych. Pierwszym ważnym pytaniem jakie się nasuwało, były różnice w spektroskopii FTIR i Ramana pomiędzy formą krystaliczną i amorficzną AmB. Odpowiedź na to pytanie jest ważna, ponieważ może dostarczyć informacji na temat agregacji tego leku w organizmach żywych którą z kolei tłumaczy się m.in. jego toksyczność [2]. Wcześniejsze badania dyfrakcji proszkowej wskazywały, że AmB i AmB-I nie krystalizuje z roztworów DMSO. Na tej podstawie wytworzyłem cienkie warstwy amorficznej AmB i AmB-I poprzez szybkie odparowanie tego rozpuszczalnika, które następnie zmierzyłem za pomocą techniki FTIR. Te wyniki oraz rezultaty spektroskopii ramanowskiej doprowadziły do scharakteryzowania pasma przy ok.  $1010\text{ cm}^{-1}$ , specyficznego dla formy krystalicznej w obu technikach spektroskopowych. Ponieważ pasmo to pojawia się w błonach lipidowych zawierających AmB, na podstawie powyższego eksperymentu można wnioskować, że AmB w nich zagregowane ma podobną strukturę jak w kryształach. Z tego wynika, że jak w modelowych błonach lipidowych AmB może pojawiać się w formie krystalicznej w organizmach żywych. W artykule tym powiązałem również budowę wewnętrzną kryształu z obserwowanymi zmianami w intensywności fluorescencji dla spolaryzowanej wiązki wzbudzającej (pomiaru wykonane we współpracy z grupą Profesora Sebastiana Maćkowskiego z Wydziału Fizyki Uniwersytetu w Toruniu), to z kolei pozwoliło wywnioskować, że moment dipolowy układu się wzdłuż najdłuższej osi kryształu a nie wzdłuż chromoforu (najdłuższej osi molekuly AmB-I), jak to ma miejsce w przypadku polienów. Wynik ten wskazuje na silne oddziaływania między warstwami w tym kierunku dla kryształu AmB.

Dysponując danymi strukturalnymi, opracowaną metodą syntezy i oczyszczania AmB-I postanowiłem wspólnie z prof. dr hab. Maruszem Gagosiem w roku 2013 napisać projekt do synchrotronu w DESY (Niemcy) na pomiary agregacji molekularnej AmB/AmB-I w monowarstwach lipidowych modyfikowanych sterolami z granicy gaz-woda. Projekt został pozytywnie rozpatrzony przez radę naukową synchrotronu, w wyniku czego mogliśmy przeprowadzić badania na nowym dyfraktometrze LISA w wiązce P08 (DESY). Było to dużym wyróżnieniem dla naszej grupy. Eksperyment przygotowywałem przez trzy miesiące razem z dr. Grzegorzem Czernielem, przeprowadzając dziesiątki iniekcji roztworów AmB i AmB-I pod powierzchnię lipidu DPPC/DOPC z ergosterolem i cholesterolem w różnych proporcjach i przy różnym ciśnieniu powierzchniowym. Dzięki temu mieliśmy dokładnie określone układy pomiarowe, jak również dysponowaliśmy precyzyjnymi procedurami, które znakomicie usprawniły pracę w synchrotronie. Sama technika pomiaru monowarstw z granicy



gaz-ciecz jest bardzo podobna do tej z dyfrakcji powierzchniowej kryształów i nie wymagało to ode mnie większego przygotowanie, natomiast dużo czasu zajęła mi obróbka danych i modelowanie, gdzie zamiast przybliżenia kinematycznego stosuje się rozwinięty model fizyczny uwzględniający – obok dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, również refrakcję, wielokrotne odbicie międzywarstwowe oraz transmisję wiązki. Rezultatem mojego modelowania jest publikacja **H4**, która po raz pierwszy tłumaczy różnice w ciśnieniu powierzchniowym pomiędzy monowarstwą DPPC zawierającą cholesterol i monowarstwą DPPC zawierającą ergosterol. Precyzyjne pomiary gęstości elektronowej w monowarstwach pokazują, że AmB wnika w takiej samej ilości do monowarstw zawierających ergosterol, jak i monowarstw zawierających cholesterol. Różnice w ciśnieniu powierzchniowym w tym przypadku muszą być spowodowane wzrostem pofałdowania dla monowarstwy zawierającej cholesterol. Jest to pewien przełom w interpretacji, gdyż do tej pory w oparciu o badania zmian ciśnienia powierzchniowego istniało przekonanie, że monowarstwy zawierające ergosterol absorbują więcej AmB (mają większy przyrost ciśnienia powierzchniowego), niż zawierające cholesterol. Odkrycie to jest istotne w zrozumieniu mechanizmów działania AmB w skali atomowej na układy biologiczne. Powyższe badania stały się inspiracją do przeprowadzenia podobnego eksperymentu dla wielowarstw lipidowych. W tym celu, jako pierwsze, przeprowadziłem badania układu AmB w środowisku wielowarstw lipidu DPPC. Pomiary te zostały wykonane we współpracy z panią Profesor Ewą Górecką i dr. hab. Damianem Pocięchą z Uniwersytetu Warszawskiego. Wynikiem tej pracy, w której analizowałem dane rentgenowskie było scharakteryzowanie kompleksu AmB-DPPC w funkcji temperatury. Dokładne pomiary FTIR, które przeprowadziłem razem z dr Martą Arczewską (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) pozwoliły na wykrycie subtelnych zmian widmowych, na podstawie których możliwe było określenie oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi cząsteczek DPPC i AmB. W tym przypadku dane FTIR opracowywałem osobiście, a wyniki konsultowałem z prof. dr hab. Mariuszem Gagosiem. Taka charakterystyka układu AmB-DPPC była niezbędna do zrozumienia przemian zachodzących w bardziej złożonych układach wielowarstw: DPPC-cholesterol-AmB oraz DPPC-ergosterol-AmB. Dysponując odpowiednią wiedzą mogłem na podstawie danych z szerokokątowej dyfrakcji rentgenowskiej (badania również przeprowadzone w grupie pani prof. dr hab. Ewy Góreckiej) scharakteryzować zmiany w tych układach. Zaskakujące w tym przypadku było to, że wielowarstwy kompleksu zawierające ergosterol charakteryzowały się większą grubością dwuwarstw od tych zawierających cholesterol, co jest dokładnie przeciwieństwem zmian

obserwowanych dla monowarstwy. Efekt ten można wytłumaczyć na podstawie oddziaływań międzywarstwowych, gdzie potencjalne pofałdowanie monowarstwy jest „prostowane” przez efekt wielowarstwowości lub powstawanie dwuwarstw w wielowarstwie. Badania te potwierdziły również większą trwałość kompleksów AmB-sterol-DPPC, niż samego kompleksu AmB-DPPC.

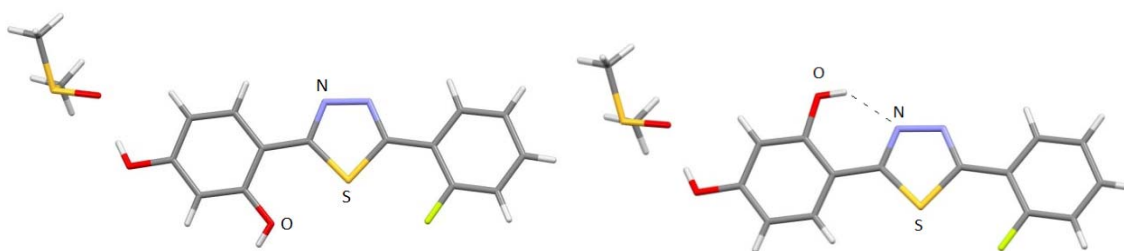
Moje pięcioletnie zaangażowanie w badania nad AmB skłoniło mnie do napisania artykułu **H1**, w którym zawarłem nie tylko przegląd literaturowy z ostatnich dziesięciu lat, odnoszący się do badań chemicznych, biochemicznych oraz biofizycznych oddziaływań AmB z błonami lipidowymi modyfikowanymi steroli, ale również podzieliłem się w nim moimi przemyśleniami na ten temat. Według mnie, większość dostępnych badań koncentruje się na efektach agregacji AmB w modelowych układach błon lipidowych. Bardzo często w literaturze biofizycznej zapomina się o tym, że organizmy żywe takie, jak grzyby mają również ściany komórkowe, które w tym procesie transportu/dyfuzji AmB do ściany komórkowej odgrywają ważną rolę. W tym przypadku mykozamina (fragment AmB) bardzo przypomina acetyloglukozaminę, będącą budulcem chityny. Wyraźna korelacja pomiędzy ilością ergosterolu zawartego w błonach a przewodnictwem jonowym porów AmB w układach modelowych nie ma bezpośredniego przełożenia na większą skuteczność tego antybiotyku w walce ze szczepami *Candida albicans* o stwierdzonej wyższej zawartości tego sterolu w błonie komórkowej. Tłumaczenie działania AmB tylko na podstawie właściwości błonowych może być również błędne, gdyż związek ten jest odpowiedzialny za efekty rodnikowe i oksydacyjne w błonie, co może prowadzić do jej uszkodzenia i w konsekwencji również wycieku ważnych życiowo składników z jej wnętrza. Bardzo ważnym zagadnieniem, poruszonym przeze mnie w tej pracy jest też duża wrażliwość tego związku na utlenianie, ze względu na układ siedmiu sprzężonych wiązań podwójnych. Proces ten jest szczególnie wzmocniony, gdy związek jest wystawiony na działanie promieniowania UV. Ma to istotne znaczenie przy wszelkiego rodzaju pomiarach fluorescencyjnych lub spektroskopii UV/Vis. Pisząc tę pracę przeglądową chciałem zwrócić uwagę na fakt, że dużo istotnych prac odnoszących się do tematyki AmB zostało stworzonych przez polskich naukowców, jak np. prof. dr hab. J. Mazerskiego i jego grupę, prof. dr hab. E. Borowskiego, prof. dr hab. P. Dynarowicz-Łątkę i jej grupę, czy prof. dr hab. W. I. Gruszeckiego i jego współpracowników. Potwierdzeniem tego jest list, jaki otrzymałem od Profesora M. Muraty (Osaka University, Japonia), w którym bardzo pozytywnie i z uznaniem wyrażał się o dokonaniach i wkładzie polskich naukowców w badania AmB.

Przedstawione prace były po części finansowane z projektu NCN (OPUS: UMO-2012/05/B/NZ1/00037), temat: „Badania aktywności biologicznej antybiotyku amfoterycyny B kompleksowanego jonami miedzi (II) oraz modyfikowanego oksydacyjnie na układach modelowych błon lipidowych oraz *in vitro*”, kierowanego przez prof. dr hab. M. Gagosią, przy tworzeniu którego miałem duży udział.

### 1,3,4-tiadiazole

Równolegle do badań AmB zajmuję się również - we współpracy z prof. dr hab. M. Gagosiem - badaniami różnych pochodnych 1,3,4-tiadiazolu. Związki te charakteryzują się unikalnym połączeniem podstawnika rezorcynowego i pierścienia 1,3,4-tiadiazolowego tworzonego w jednoetapowej reakcji. 5-podstawiony-(1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol jest to grupa ok. 170 związków otrzymanych przez prof. dr hab. Andrzeja Niewiadomego, charakteryzująca się właściwościami przeciwo proliferacyjnymi, przeciwgrzybiczymi, przeciwbakteryjnymi oraz aktywnością neuroprotektoryjną, jak również przeciwnowotworową. Ich aktywność biologiczną można tłumaczyć m. in. specyficzną geometrią i oddziaływaniem z białkami w organizmach żywych [3-5]. O znaczeniu pochodnych tiadiazoli we współczesnej nauce świadczy ilość rekordów (ok. 100) odnoszących się do kompleksów białek z tymi substancjami w Protein Data Bank. Wybrany przeze mnie do badań związek 2-(4-fluorofenylamino)-5-(2,4-dihydroksybenzeno)-1,3,4-tiadiazol (FABT), charakteryzuje się aktywnością w stosunku do: komórek raka piersi, komórek rakowych jelita grubego oraz posiada potwierdzoną aktywność w stosunku do komórek glejaka C6, przy czym dawki lecznicze nie działają toksycznie na komórki prawidłowe. W celu poznania jego struktury, przeprowadziłem badania, które doprowadziły mnie do metody otrzymywania kryształów w/w związku, jak również innych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli. Dużym utrudnieniem była czystość substratów; z tego powodu w pierwszej fazie badań dużą część uwagi poświęciłem oczyszczaniu tych związków. W pracach tych którymi kierowałem pomagał mi dr Arkadiusz Matwiczuk (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie). Prace **H7** i **H8** odnoszą się do krystalizacji oraz charakterystyki strukturalnej 2-(4-fluorofenylamino)-5-(2,4-dihydroksybenzeno)-1,3,4-tiadiazolu (FABT) w formie jonowej i molekularnej. W badaniach tych oprócz opracowania metody krystalizacji tej grupy związków zajmowałem się również wyjaśnieniem zjawisk polimorfizmu i solwatomorfizmu obserwowanego dla FABT. Dodatkowo wykonałem obliczenia DFT dla różnych konformacji FABT, korzystając z

programu GAUSSIAN 09. Obliczenia w programie OPIX i CRYSTAL wykonała dr Anna Hoser (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego). Natomiast w znacznej części w przedstawionych artykułach wykonałem analizę danych strukturalnych, opis struktur oraz charakterystykę i opis oddziaływań międzycząsteczkowych w sieci krystalicznej w oparciu o dane strukturalne i obliczeniowe. Artykuły te dostarczają ważnych informacji dotyczących konformacji molekuly FABT w zależności od rozpuszczalnika wbudowanego w sieć kryształu. Częsteczka FABT występuje w kryształach w dwóch konformacjach, w zależności od solwatu: z grupą hydroksylową pierścienia rezorcylowego w pozycji *orto*, skierowaną do atomu siarki z pierścienia tiadiazolowego („S”) i z tą samą grupą skierowaną do atomu azotu („N”), również z pierścienia 1,3,4-tiadiazolowego. Obliczenia kwantowe w programie Gaussian 09 metodą B3LYP z bazą 6-31++(d,p) i 6-31(d,p) dla pojedynczej molekuly wskazują na różnicę energii pomiędzy formami "S" i "N", wynoszącą ~30 kJ. Bariera rotacji podstawnika rezorcynowego związana z przejściem jednej formy w drugą wynosi ~50 kJ. Zastosowanie bazy z orbitalami dyfuzyjnymi zauważalnie obniża energię układu w konformacji "N". W obu bazach konformacja „N” ma energię niższą, za sprawą utworzenia bardziej trwałego układu pseudoheteroaromatycznego pierścienia z wiązaniem wodorowym. Jednak zysk energetyczny z powstania takiej struktury często nie jest uprzywilejowany w układach krystalicznych. Efekty sieciowe związane z powstawaniem wiązań wodorowych pomiędzy grupą –OH i atomem azotu z sąsiedniej molekuly, częściej faworyzują konformację „S”. Potwierdzeniem tego jest układ sieci kryształu jednego z 1,3,4-tiadiazoli, w którym cząsteczka 1,3,4-tiadiazolu występuje w dwóch konformacjach „S” i „N”, rys. 2. Występowanie obu konformacji o zbliżonych energiach jest prawdopodobnie czynnikiem odpowiedzialnym za trudności w krystalizacji tej grupy związków.



**Rys. 2.** Dwie konformacje „S” (po lewej) i „N” (po prawej) 1,3,4-tiadiazolu występujące w tej samej sieci krystalicznej. Struktura zmierzona, rozwiązana i udokładniona w grupie prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka z Uniwersytetu Warszawskiego.

Badania strukturalne były szczególnie pomocne w korelacji danych spektroskopowych z konformacją FABT, mierzonego w różnych rozpuszczalnikach, praca **P20** (praca ta jest wyróżniona przez edytora, nie tylko jako open access ale jest również pierwszą pracą otwierającą cały rocznik 2011 publikacji *J. Fluorescence*, issue 1, strona 1). Dodatkowo praca ta przedstawia wpływ temperatury, polarności i polaryzowalności rozpuszczalników na równowagę pomiędzy formą ketonową i enolową FABT w roztworach. W tym przypadku obie formy można powiązać z konformacją "N" i "S". Dla konformacji "S" związek może występować tylko w formie enolowej, natomiast dla konformacji "N" możliwy jest wewnątrzcząsteczkowy transfer protonu, prowadzący do powstania formy ketonowej. Efektem tych badań jest powiązanie polaryzowalności rozpuszczalnika (nie polarności) na przesunięcie równowagi w kierunku konformacji „N”. Efekt ten nie był wcześniej opisywany w literaturze światowej. Dodatkowo dla kryształów z konformacją „S” obserwowana jest pojedyncza fluorescencja, podczas gdy dla kryształów z konformacją „N” widoczna jest podwójna fluorescencja. Zjawisko to odkryte i opisane w pracach **H7**, **H8** i **P20** - może mieć istotne znaczenie w zrozumieniu wysokiej aktywności 1,3,4-tiadaizoli w układach biologicznych, gdzie cząsteczka FABT może przyjąć jedną ze swoich konformacji w zależności do środowiska, w jakim występuje. Na przykład w środowisku hydrofobowego wnętrza błony lipidowej może występować w konformacji "N", co może wpłynąć na zwiększenie jego przenikalności przez błonę lipidową. Dysponując widmami obu form „S” i „N” FABT (i innych pochodnych 1,3,4-tiadiazolowych), możliwe jest jego zastosowanie jako detektora pH środowiska, w jakim on występuje, praca **P20**. Znajomość widm FTIR związku dla obu konformacji może szybko dostarczyć cennych informacji o jego ułożeniu w centrum aktywnym białka.

Do tej pory udało się skryzalizować i zmierzyć około 20 kryształów z tej grupy związków, a efektem tego są obecnie tworzone dwie nowe prace. Struktury wszystkich otrzymanych kryształów są wyznaczane metodami rentgenowskiej dyfrakcji strukturalnej w grupie prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego), a wyniki tych pomiarów zamieszczane są w bazie krystalograficznej Cambridge Crystallographic Data Centre.

Ze względu na amfifilowy charakter FABT - wpływa on na właściwości fizyczne błony lipidowej. W pracy **H9** przedstawiłem uproszczony diagram fazowy dla układu DPPC-FABT. Wyniki pracy wskazują na obniżenie temperatury głównego przejścia fazowego lipidu w zależności od ilości FABT w wielowarstwie. Może to wskazywać na większą płynność

blony po absorpcji FABT, co jest efektem pożądanym w przypadku przenikalności substancji biologicznie aktywnych przez błony komórkowe. Również po raz pierwszy w badaniach wielowarstwy lipidowej zastosowałem pomiary refrakcji według opracowanej przeze mnie metody. Ideę prezentowanych pomiarów zaczerpnąłem z teoretycznej pracy Xiaominga [6]. Według szacunków, efekt ten powinien być mierzalny dla układów lipidowych z dobrze wykształconymi warstwami. Pomiar taki pozwala obliczyć stosunek indeksów refrakcji pomiędzy dwoma warstwami, co z kolei równoważne jest stosunkowi elektronów zawartych w tych warstwach. Ta dodatkowa informacja pojawiająca się w pomiarach dyfrakcyjnych wielowarstw może być pomocna w interpretacji modelowanych gęstości elektronowych zwłaszcza wtedy, gdy różnice w tych gęstościach są na granicy błędu pomiarowego tradycyjnymi metodami. Powstający powyżej przejścia fazowego lipidu kompleks FABT-DPPC jest trwały nawet w temp. 70 °C. Na podstawie danych rentgenowskich oraz metodologii przedstawionej w pracy Quinna [7], mogłem również oszacować stosunek stechiometryczny powstałego kompleksu jako 1:4 do 1:6 pomiędzy FABT a DPPC.

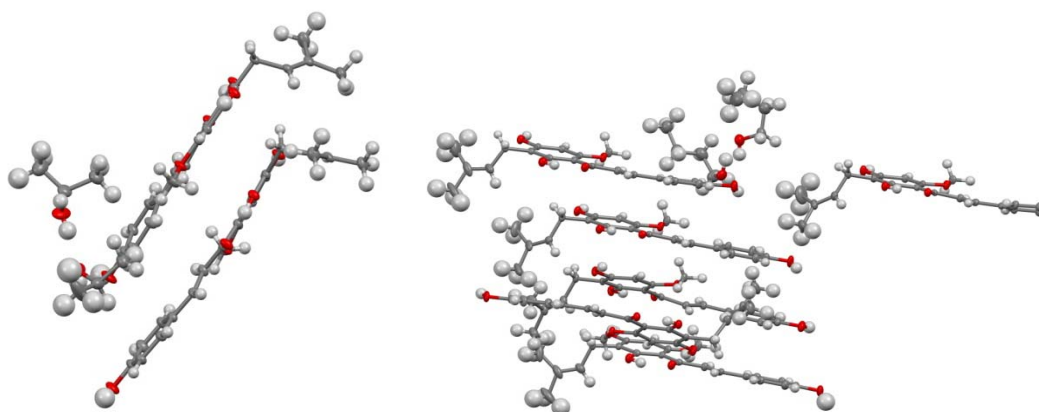
### **Ksantohumol**

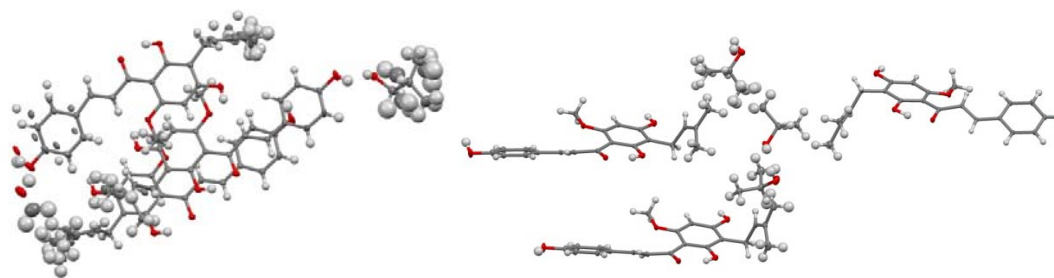
Ostatnim związkiem, który prezentuję w dorobku habilitacyjnym jest ksantohumol (XN). Tematyką tego związku zainteresował mnie również prof. dr hab. Mariusz Gagoś. Efektem zaangażowania w badania nad tym związkiem był mój udział w tworzeniu projektu badawczego NCN (N N 209 0324 40), jak i udział w nim, gdzie zajmowałem się krystalizacją XN oraz badaniami błonowymi przedstawionymi w pracy **H10**. XN, jako jeden z flawonoidów występuje m.in. w szyszkach chmielowych. Jednak w procesie ekstrakcji nadkrytycznej ditlenkiem węgla związek ten nie przechodzi do ekstraktu, co znacząco obniża walory zdrowotne produktów takich, jak np. piwo, bazujących na tym substracie. XN ma udowodnione działanie przeciwrakowe i jest stosowany w profilaktyce chorób krążenia. *In vitro* XN działa na raka piersi (MCF-7), raka jelita grubego (HT-29), raka jajnika (A-2780) i prawdopodobnie na raka prostaty. Dodatkowo XN zmniejsza ryzyko zachorowania na chorobę wieńcową przez inhibicję utleniania lipoproteid niskiej gęstości. XN wpływa również korzystnie na gęstość tkanki kostnej, co może mieć znaczenie w leczeniu osteoporozy. Częściowo działanie XN tłumaczy się jego właściwościami antyoksydacyjnymi a także zwiększeniu aktywności enzymów odpowiedzialnych za neutralizację wolnych rodników. Dużym problemem w stosowaniu tego związku jest jego niska przyswajalność związana

częściowo z jego agregacją w fizjologicznym stężeniu jonów wodorowych. Z tego powodu stosuje się różne suplementacje XN. Duża liczba patentów związanych z tym związkiem świadczy o jego dużym potencjale prozdrowotnym.

W mojej pracy skupiłem się także na krystalizacji i właściwościach błonowych ksantohumolu (XN). Wykorzystując swoje wieloletnie doświadczenie udało mi się wykrystalizować cztery nowe solwaty alkoholowe XN, które występują w różnych odmianach polimorficznych (Rys. 3). Dużym utrudnieniem w tym przypadku były zanieczyszczenia od innych flawonoidów, które niekorzystnie wpływały na proces krystalizacji. Dodatkowo XN ma naturalną tendencję do agregacji, która prowadzi do form amorficznych, a jego przegrzanie w procesie oczyszczania może prowadzić do powstania izoksantohumolu - utrudniającego krystalizację. Wszystkie otrzymane przeze mnie kryształy nie były jeszcze przedstawione w literaturze światowej i są tematem powstającej obecnie nowej pracy. Dane strukturalne wskazują, że XN może w kryształach przybierać różne konformacje oraz odkształcać swój szkielet w zależności od upakowania sieci kryształu. Jest to ważna informacja, gdyż wskazuje to na jego duże możliwości adaptacji kształtu - w zależności od otoczenia. Prawdopodobnie ma to duże znaczenie w oddziaływaniach z białkami organizmów żywych.

Wysoką aktywność XN w układach biologicznych można po części tłumaczyć oddziaływaniem z lipidami. W celu charakterystyki jego właściwości błonowych przeprowadziłem razem z dr Martą Arczewską (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) badania dyfrakcyjne i spektroskopowe, w których wykorzystałem w/w kryształy jako substrat, praca **H10**.





**Rys. 3.** Nowe struktury czterech różnych solwatów alkoholowych XN. Pomiary oraz rozwiązanie i udoładnienie struktur zostało wykonane w grupie prof. dr hab. Krzysztofa Woźniaka z Uniwersytetu Warszawskiego.

Tak, jak w przypadku FABT, również dla XN zastosowałem podczas analizy refleksów dyfrakcyjnych opisaną wyżej metodę pomiaru refrakcji. Porównanie pomiarów refrakcji dla FABT i XN pokazuje, że obie substancje oddziałują z błoną lipidową w odmienny sposób, zwłaszcza podczas głównego przejścia fazowego lipidu. Najprawdopodobniej jest to spowodowane odmiennym ułożeniem się cząsteczek XN i FABT w dwuwarstwie lipidowej podczas przejścia fazowego. Podobnie do FABT, również XN tworzy trwałe kompleksy z lipidem, na co wskazują badania dyfrakcyjne. Korelacja danych dyfrakcyjnych i spektroskopowych dla różnych temperatur doprowadziła mnie do przedstawionego w artykule modelu dwuwarstwy lipidowej, według którego cząsteczki te poniżej głównego przejścia fazowego gromadzą się w części polarnej lipidów. Powyżej przejścia fazowego cząsteczki XN najprawdopodobniej agregują poza dwuwarstwą.

Obecnie w grupie Profesora Mariusza Gagosia został złożony projekt suplementacji ksantohumolu, w którego tworzeniu brałem udział, a wyniki przedstawione w pracy **H10** były podstawą proponowanych w nim przyszłych badań.

## **4.5. Główne dokonania naukowe**

### **4.5.1. Przed uzyskaniem tytułu doktora**

- Wyjaśnienie wpływu pH roztworu na morfologię kryształów KDP, badania przedstawione w pracach **P08**, **P11**;
- Współudział w wyjaśnieniu morfologii kryształów NaCl (próby wyjaśnienia tego problemu trwały od 200 lat), prace **P9**, **P12**;
- Stworzenie diagramu fazowego dla układu Bi-Cu(111) oraz określenie struktur powierzchniowych poszczególnych faz, odkrycie cieczy powierzchniowej o lokalnym uporządkowaniu romboedrycznym, a nie heksagonalnym. Wyniki te są przedstawione w pracach **P10**, **P13**;



#### 4.5.2. *Podczas stażu post-doktorskiego w Niemczech*

- Badania zmian struktury powierzchni kryształu złota podczas jego wzrostu z roztworu z rozdzielczością subsekundową. Wyniki te zostały przedstawione w pracy **P15**;
- odkrycie zjawiska rozpuszczania monowarstw kryształu złota layer-by-layer i stworzenie opisującego go modelu fizycznego. Możliwość „nakładania” i „zdejmowania” dokładnie jednej monowarstwy metalu może mieć kluczowe znaczenie dla wytwarzania układów elektronicznych w skali atomowej. Badania te są przedstawione w pracy **P18**;

#### 4.5.3. *Cykl badań przedstawiony jako osiągnięcie naukowe*

- synteza, oczyszczanie i krystalizacja jodopochodnej amfoterycyny B. Nowe kryształy pozwoliły na wyznaczenie struktury AmB wielokrotnie lepiej od tej przedstawionej w pracy Ganisa [1], praca **H2**. Skorelowanie wyników spektroskopowych z formą krystaliczną i amorficzną tego antybiotyku, praca **H3**. Wyniki tych badań pozwalają stwierdzić - bazując tylko na danych spektroskopowych, w jakiej formie występuje amfoterycyna B na przykład w błonie lipidowej lub w rzeczywistym układzie biologicznym;
- wyjaśnienie efektu większego ciśnienia powierzchniowego dla monowarstw lipidowych zawierających ergosterol w porównaniu do monowarstw zawierających cholesterol, praca **H4**. Badania te wskazują również na takie samo stężenie amfoterycyny B w monowarstwach zawierających cholesterol, co i monowarstwach zawierających ergosterol. Efekt ten skorelowany jest z morfologią powierzchni.
- krystalizacja układów 1,3,4-tiadiazoli w formie jonowej i neutralnej, prace **H8, H9**. Współdziałal w korelacji efektów spektroskopowych z konformacją 1,3,4-tiadiazoli z grupą rezorcynową oraz wewnątrzcząsteczkowym transferem protonu **P20**;
- charakterystyka organizacji molekularnej 1,3,4-tiadiazolu oraz ksantohumolu w wielowarstwach lipidowych z zastosowaniem nowatorskiej techniki pomiaru refrakcji promieniowania rentgenowskiego **H8, H9**.

**Literatura:**

1. P. Ganis, Avitabil.G, Mechlins.W and Schaffne.Cp, Journal of the American Chemical Society, **93** (1971) 4560-&.
2. K. Yamashita, V. Janout, E.M. Bernard, D. Armstrong and S.L. Regen, Journal of the American Chemical Society, **117** (1995) 6249-6253.
3. B.J. Stockman, D.J. Waldon, J.A. Gates, T.A. Scahill, D.A. Kloosterman, S.A. Mizzak, E.J. Jacobsen, K.L. Belonga, M.A. Mitchell, B. Mao, J.D. Petke, L. Goodman, E.A. Powers, S.R. Ledbetter, P.S. Kaytes, G. Vogeli, V.P. Marshall, G.L. Petzold and R.A. Poorman, Protein Sci, **7** (1998) 2281-6.
4. V. Menchise, G. De Simone, A. Di Fiore, A. Scozzafava and C.T. Supuran, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **16** (2006) 6204-6208.
5. C. Temperini, A. Cecchi, N.A. Boyle, A. Scozzafava, J.E. Cabeza, P. Wentworth, Jr., G.M. Blackburn and C.T. Supuran, Bioorg Med Chem Lett, **18** (2008) 999-1005.
6. J. Xiaoming and W. Ziqin, Chin. Phys. Lett., **8** (1991)
7. P.J. Quinn, H. Takahashi and I. Hatta, Biophys J, **68** (1995) 1374-82.

## 5. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego (w oparciu o załącznik 4)

Mój łączny dorobek stanowi 57 pozycji, w tym:

- 35 oryginalnych prac twórczych, w tym po doktoracie 21;
- 4 rozdziałów w monografiach, po uzyskaniu stopnia doktora;
- 16 komunikatów na konferencjach międzynarodowych, 9 po uzyskaniu stopnia doktora;
- 5 komunikatów na konferencjach krajowych, po uzyskaniu stopnia doktora.

### 5.1. Wskaźniki dokonań naukowych

- Sumaryczny *impact factor* według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania: 119,127;
- Suma punktów za publikacje, zgodnie z rokiem opublikowania: 990;
- Liczba prac opublikowanych w czasopismach indeksowanych przez JCR wynosi **35** (łącznie **990** punktów, co stanowi **97,68%** ogólnej liczby punktów);
- Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) **267** (wszystkich), **225** (bez aucytowań) – z dn. 05.03.2015;
- Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **10** – z dn. 05.03.2015.

## 5.2 Liczbowe zestawienie dorobku naukowego

Rodzaj publikacji	Liczba	Punkty MNiSW*	IF*
<b>Przed uzyskaniem stopnia doktora</b>			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	15	346	51,799
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	-	-	-
Rozdziały w monografiach	-	-	-
<b>Łącznie publikacje:</b>	<b>15</b>	<b>346</b>	<b>51,799</b>
<b>Po uzyskaniu stopnia doktora</b>			
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	21	630	67,328
W tym stanowiące szczególne osiągnięcia	10	307	32,566
Publikacje w czasopismach recenzowanych innych niż znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)	-	-	-
W tym stanowiące szczególne osiągnięcia	-	-	-
Rozdziały w monografiach	4	12	-
W tym stanowiące szczególne osiągnięcia	-	-	-
<b>Łącznie publikacje:</b>	<b>25</b>	<b>642</b>	<b>67,328</b>
<b>Komunikaty naukowe</b>			
- przed uzyskaniem stopnia doktora	7		
- po uzyskaniu stopnia doktora	9		
<b>Łącznie komunikaty naukowe:</b>	<b>16</b>		
<b>RAZEM:</b> (oryginalne prace naukowe oraz komunikaty naukowe)	<b>57</b>	<b>988</b>	<b>119,127</b>

\* zgodnie z rokiem wydania

### 5.3 Zestawienie czasopism, w których opublikowano prace naukowe

Czasopismo	Punkty MNiSW*	Liczba prac		Suma punktów
		Przed doktoratem	Po doktoracie	
<b>Czasopisma znajdujące się w bazie <i>Journal Citation Reports</i> (JCR)</b>				
Biochim Biophys Acta.	35		3	105
Biometals	20		1	20
Crystal Growth & Design	40	1	2	120
Crystal Ing. Com.	35		1	35
European Biophysics Journal	20		1	20
European J. of Inorg. Chem.	30	1		30
Faraday Discussion	35	1		35
Food Research International	40	1		40
J. of Electroanalytical Chem.	30		2	60
J. Phys. Chem. C	35	1	1	70
Journal of Chemical Physics	35	1		35
Journal of Fluorescence	25		1	25
Journal of Mol. Struc.	20		2	40
Natural Prod. Comm.	20		1	20
Phys. Rev. B	35	2	2	140
Physical Review Letters	45	2	1	135
Radiation Phys. and Chem.	20		1	20
Surface Science	25	3	1	100
J. Chem. Phys.	35	1		35
J. Phys. Chem. B	30		1	30
<b>Rozdziały w monografiach w języku angielskim**</b>	6		1	6
<b>Rozdziały w monografiach w języku polskim**</b>	2		2	4
<b>Komunikaty naukowe na konferencje międzynarodowe</b>		7	5	
<b>Komunikaty naukowe na konferencje krajowe</b>			4	
<b>RAZEM</b>		<b>21</b>	<b>33</b>	<b>1125</b>

\* wg Komunikatu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 17 grudnia 2013 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych wraz z liczbą punktów przyznawanych za publikacje w tych czasopismach

\*\* wg Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 sierpnia 2012 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania kategorii naukowej jednostkom.