



UNIwersYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-952 Gdańsk, ul. J. Sobieskiego 18, tel. (+48 58) 523 5315, fax (+48 58) 523 5472, e-mail: joanna.makowska@ug.edu.pl, www.chem.ug.edu.pl

dr hab. Joanna Makowska, prof. nadzw. UG

Recenzja

rozprawy doktorskiej **Magister Urszuli Anny Judyckiej** zatytułowanej:

„Relacje aktywność biologiczna/terapeutyczna – właściwości fizykochemiczne chemoterapeutyków amfolitycznych wynikające z badań spektralnych i chromatograficznych oraz analiz na gruncie obliczeniowym i chemometrii”

Gdańsk, 14 marca 2019 r.

Modele teoretyczne rozpatrujące zależność: struktura związku chemicznego np. leku a jego aktywność (ang. *structure–activity relationship model*, SAR) i modele ilościowe dla takiej zależności (ang. *quantitative structure–activity relationship model*, QSAR) są modelami matematycznymi, które można wykorzystywać do przewidywania fizykochemicznych oraz biologicznych właściwości związków, a także do opisu sposobu ich specyficznego zachowania w różnym środowisku na podstawie znajomości właściwie tylko ich budowy chemicznej. Zależności właściwość chemiczna/ biologiczna a struktura można ilościowo opisać stosując odpowiednie równania matematyczne. Z tego względu modele QSAR mogą odgrywać rolę alternatywną dla badań eksperymentalnych w zakresie wyznaczania parametrów fizykochemicznych np. rozpuszczalności, stabilności termicznej, właściwości spektroskopowych oraz aktywności biologicznej rozpatrywanych związków. Posiadając dane eksperymentalne dla części związków z poddanej badaniom grupy chemikaliów np. leków oraz znając wartości tzw. deskryptorów strukturalnych wszystkich związków z tej grupy można przewidzieć właściwości dla podobnych substancji, dla których brak jest danych eksperymentalnych z uwagi na czasochłonność, zbyt duży koszt lub niejednokrotnie niewykonalność doświadczenia.

Modele (Q)SAR muszą mieć ustaloną ważność naukową, a substancja musi należeć do dziedziny zastosowania modelu. Podobnie jak w przypadku każdej innej formy danych, konieczne jest dostarczenie wystarczającej dokumentacji, która umożliwi niezależną ocenę wyników.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy określenia właściwości spektralnych i parametrów chromatograficznego rozdzielania 40 wyselekcjonowanych związków o właściwościach amfolitycznych, wykazujących aktywność biologiczną i mających znaczenie terapeutyczne.

Magister Urszula Judycka wykonywała swoją pracę doktorską pod kierunkiem prof. Jerzego Błażejowskiego w Katedrze Chemii Fizycznej Wydziału Chemii UG, w ścisłej współpracy z Laboratorium Badawczym firmy Polpharma oraz Pracownią Chemometrii Środowiska Wydziału Chemii UG czego dowodzi przedstawiony przez Doktorantkę dorobek naukowy. Przejdę teraz do charakterystyki samej rozprawy doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej jest charakterystyczny dla tego rodzaju prac. Rozprawa została napisana na 89 stronach. Całość poparta jest 338 odnośnikami literaturowymi dotyczącymi badanej tematyki. Praca składa się z 9 głównych rozdziałów. Zawiera ona w końcowej części streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wydruki najważniejszych publikacji wraz z materiałami dodatkowymi, w których zawarto wyniki będące tematem desyteracji, a także oświadczenia wszystkich współautorów. Analizując przedstawione do oceny oświadczenia można jednoznacznie wyodrębnić zadania zrealizowane bądź koordynowane przez Doktorantkę.

Pracę rozpoczyna czterostronicowy *Wstęp*, w którym Doktorantka przedstawia krótko celowość zaplanowanych zadań, wprowadzając tym samym czytelnika w tematykę pracy. Kolejny rozdział stanowi część, którą można by nazwać ogólnie częścią teoretyczną, składającą się z 5 podrozdziałów liczących 51 stron. W tym fragmencie pracy Doktorantka opisuje krótko spektroskopię, metody kwantowo-chemiczne i ich zastosowanie w QSAR i farmakologii, pochodzenie wybranych parametrów fizykochemicznych analitów, a także najbardziej wg recenzenta ciekawy i pouczający rozdział o metodach chemometrycznych. W tym obszernym fragmencie pracy wielokrotnie pojawia się nazwa parametru fizykochemicznego tzw. „stała elektryczna”, podczas gdy w dalszej części pracy np. na stronie 72 oraz 73 ten sam parametr nazywany jest stałą dielektryczną. Czy wg Autorki obydwie te nazwy są poprawne i czy można je stosować zamiennie?

Część kolejna rozprawy (Rozdział 6) przedstawia cele pracy. Magister Urszula Judycka zaplanowała zrealizowanie następujących zadań:

- 1) **Wyodrębnienie**, dla czterdziestu wyselekcjonowanych związków amfolytycznych wykazujących aktywność biologiczną oraz terapeutyczną, **informacji dotyczących właściwości spektralnych oraz cech fizykochemicznych wynikających z zachowania się w trakcie rozdziałów chromatograficznych w fazach wodnych** imitujących środowisko biologiczne (żołądka, jelit, dwunastnicy)
- 2) **Przeprowadzenie analiz chemometrycznych w celu stwierdzenia czy i na ile podejście chemometryczne może być zastosowane do poszukiwania relacji między cechami biologicznymi badanych związków a ich charakterystyką fizykochemiczną.** W tym miejscu ważnym zadaniem było znalezienie równań analitycznych wiążących charakterystykę spektralną z deskryptorami fizykochemicznymi rozpatrywanych związków oraz znalezienie równań analitycznych wiążących

parametry retencji tych związków z ich deskryptorami fizykochemicznymi, które ewentualnie mogłyby być w przyszłości zastosowane do projektowania rozdzielń chromatograficznych podobnych układów oraz przewidywania oddziaływania w systemach biologicznych.

Kolejny rozdział nr 7 „Część eksperymentalna” został napisany na 13 stronach. Na wstępie Autorka w formie tabeli przedstawiła nazwy, wzory oraz pochodzenie badanych substancji chemicznych, a następnie podaje szczegóły przeprowadzonych eksperymentów. Podana została w tej części pracy charakterystyka używanej w trakcie przeprowadzania doświadczeń aparatury, odczynników, zastosowanych wypełnień w kolumnach chromatograficznych, a także warunki pomiarów chromatograficznych. W tym fragmencie pracy (str.71) pojawia się stwierdzenie, że „W pH 7,0 związki czy to o cechach kwasowych czy zasadowych pozostają niezdisocjowane”. To jest stwierdzenie nieprawdziwe. Dysocjacja związku chemicznego w roztworze zależy od jego właściwości kwasowo-zasadowych opisywanych przez tzw. wartość stałej kwasowości pK_a (lub stałą zasadowości pK_b). Jeżeli wartość stałej pK_a dla grupy funkcyjnej związku zdolnej do dysocjacji protonu jest mniejsza od 7, to w pH 7,0 stężenie procentowe formy zdeprotonowanej będzie wyższe niż formy sprotonowanej. Leki najczęściej są związkami wielofunkcyjnymi i zawierają w swojej strukturze kilka różnych grup charakteryzujących się różnymi wartościami pK_a . Rozpatrując np. L-cysteinę (związek nr 27 w Tabeli 1) musimy wziąć pod uwagę aż trzy miejsca w cząsteczce zdolne do odszczepiania bądź przyjmowania protonu. I tak w pH ~7,4 (fizjologicznym) grupa karboksylowa będzie zdeprotonowana całkowicie ($pK_a=1,71$), podczas gdy pozostałe dwie grupy aminowa ($pK_a=8,33$) oraz sulfidowa ($pK_a=10,78$) będą nadal sprotonowane, odpowiednio w ok. 90% oraz 10%. Jeżeli weźmiemy pod uwagę związek chemiczny o nazwie GABA rozpatrywany przez Doktorantkę i podany jako substancja 5 w Tabeli 1 (str. 62) to w pH~7 związek będzie występował w postaci zwitterjonu (wartość $pK_{aCOOH} = 4,53$, $pK_{aNH_2} = 10,22$). Idąc dalej, związek nr 10 z tabeli (sulfadimetoxine) w fizjologicznym pH będzie występował w formie anionu (zasada Brönsteda), gdyż $pK_{a1}=1,95$ natomiast $pK_{a2}=6,91$. A zatem stwierdzenie, że w pH=7 niezależnie od charakteru związku są one niezdisocjowane jest błędne.

Rozpatrzmy dwa przypadki: leku o charakterze kwasu Brönsteda (HA) i leku o charakterze zasady Brönsteda (B). Kwas HA, w formie niezdisocjowanej będzie łatwo przekraczał bariery lipidowe. Będzie to miało miejsce na przykład w żołądku, gdzie pH wynosi 1-3 i w takim środowisku związki, których grupy funkcyjne scharakteryzowane są przez wartości stałych $pK_a <4-6>$ będą występowały w formie niezjonizowanej. Z kolei związki o charakterze zasadowym B będą występowały w żołądku w formie sprotonowanej BH^+ i jako zjonizowane nie przekroczą błony komórek wyściełających żołądek. Związki słabozasadowe o wartościach $pK_a <7-9>$ będą lepiej wchłaniane w dalszej części przewodu pokarmowego, gdzie pH jest alkaliczne. W takim środowisku dominującą formą związków jest ich postać niesprotonowana

(związki zasadowe występują w formie niesprotonowanej). Prosiłabym o komentarz do tej części rozprawy w odniesieniu do badanych związków.

Następny rozdział rozprawy, rozdział nr 8, zajmuje 12 stron i został zatytułowany „*Wyniki i dyskusja*”. Ta część dysertacji jest podzielona na 4 podrozdziały, w których Doktorantka opisuje skrótowo wyniki swoich badań oprawiając je krótką dyskusją. Dane szczegółowe zostały podane w załączonych wydrukach publikacji (zał. I-IV). W załączniku I. (*Spectrochimica Acta A*) opisane są w sposób szczegółowy wyniki badań spektralnych dla 40 biologicznie aktywnych związków oraz opis analizy chemometrycznej dla tych związków (znalezienie korelacji pomiędzy 9 charakterystykami widmowymi a 31 parametrami fizykochemicznymi uzyskanymi na drodze obliczeniowej). W tym miejscu Doktorantka podaje, iż uzyskane metodą łączoną *GA-PLS* zależności „zostały zwalidowane stosując rekomendowane w chemometrii podejścia”. To sformułowanie pojawia się dwukrotnie (str. 76, 78). W trakcie obrony rozprawy doktorskiej recenzent prosi o wyjaśnienie jakie podejścia miała Doktorantka na uwadze. W załączniku II. (*Journal of Chromatography B*) opisana jest korelacja między parametrami retencji dla niepolarnych kolumn HPLC, a wybranymi właściwościami fizykochemicznymi dla badanych 40 substancji. Badania dostarczyły informacji na temat lipofilowości układów. W załączniku III. (*Structural Chemistry*) opisane jest korelacja między parametrami retencji dla niepolarnych (opisanych wcześniej w zał. II) i semipolarnych kolumn HPLC w dwóch różnych pH: 2,5 i 7,0 a 32 deskryptorami opisującymi cechy fizykochemiczne uzyskane głównie na drodze obliczeń. W tym załączniku zestawiono parametry retencji, które stanowią unikatowe źródło o zdolności separacyjnej stosowanych w pracy kolumn HPLC. W załączniku IV. (*Chemical Physics Letters*) przedstawione zostały wyniki analiz chemometrycznych, których celem było zbadanie możliwości rozróżnienia aktywnych biologicznie związków korelując cechy terapeutyczne z deskryptorami fizykochemicznymi.

W rozdziale nr 9 zostały zawarte wnioski zapisane na 2 stronach. Jest to zwięzłe i syntetyczne przedstawienie najważniejszych wyników uzyskanych w toku realizacji pracy doktorskiej przez Mgr Urszulę Judycką. Wykorzystując narzędzia chemometrii (4 metodologie) znaleziono możliwość rozróżniania związków o charakterze amfolytycznym pod kątem specyficznych cech biologicznych lub aktywności terapeutycznej.

Dysertacja została napisana jasno i przejrzysto. Język, którego używa Autorka wskazuje na Jej dojrzałość naukową i dobre rozeznanie w tematyce prowadzonych badań. Pomimo jednak starannej korekty zdarzają się w pracy powtórzenia (we wstępnej części pracy), drobne błędy językowe (np. str. 7 pracy, rozdział pt. Wstęp „*n-otanol/woda*” powinno być *n-oktanol/woda*, str. 74 „*Część parametrów uzyskano prowadząc optymalizacji geometrii...*” powinno być *optymalizację geometrii*), a także stwierdzenia żargonowe t.j. „*program zbierający dane*” powinno być raczej *program zapisujący dane*, „*Spektroskopia zajmuje się teorią i interpretacją widm.*” (str.9) powinno być raczej „*Spektroskopia to nauka (dział fizyki) o*

powstawaniu i interpretacji widm(...)”. W tekście zdarzyły się również niefortunne tłumaczenia angielskich nazw metod matematycznych np.”(...) *goodness-of-fit* jako kryteria dobroci dopasowania”, powinno być raczej jakość dopasowania itp.

Wszystkie zawarte w recenzji uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej opinii o przedstawionej mi do oceny rozprawie. Zawiera ona wymagane elementy nowości naukowej potwierdzone wynikami naukowymi wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawą o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. Ust. nr 65, poz. 595) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. nr 204, poz. 1200, z dnia 22 września 2011 r.), a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

KIEROWNIK
Katedra Biologicznej Chemii Nieorganicznej
Department of Chemistry, University of Gdansk

Joanna Makowska
dr hab. Joanna Makowska, prof. UG