

prof. dr hab. inż. Waldemar Wardencki
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Anny Judyckiej

pt.

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

zrealizowanej w Katedrze Chemii Fizycznej,

Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,

pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jerzego Błażejowskiego.

Wprowadzanie nowej substancji jako leku jest procesem długotrwałym i kosztownym. Istotną rolę w przewidywaniu użyteczności danego związku jako leku odgrywa analiza jego właściwości fizykochemicznych i ich powiązanie z aktywnością biologiczną, szczególnie terapeutyczną. Przykładowo, współczynnik podziału definiowany jako stosunek stężeń równowagowych danej substancji w wodzie i n-oktanolu, jest miarą jej hydrofobowości oraz zdolności do przenikania przez błony biologiczne i dotarcia do miejsca działania leku. Jest to szczególnie istotne w przypadku leków działających na ośrodkowy układ nerwowy, dla których istotnym parametrem jest zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg. Właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna mogą być wyznaczone doświadczalnie, co jest zarówno czasochłonne jak i kosztowne. Alternatywą dla takiego postępowania jest matematyczne określenie zależności między strukturą chemiczną, reprezentowaną przez zbiór tzw. deskryptorów (strukturalnych, termodynamicznych, elektronowych) a właściwościami fizykochemicznymi (QSPR) lub aktywnością biologiczną (QSAR). Badania takie są przedmiotem zainteresowania wielu badaczy od momentu stwierdzenia, że aktywność biologiczna/terapeutyczna związku chemicznego jest związana z jego strukturą. Dzięki badaniom ilościowym zależności struktura-aktywność można

przewidywać (modelować) efekt terapeutyczny nieznanymi związków na podstawie ich właściwości fizykochemicznych lub innych cech związanych ze strukturą.

Zasadniczy wpływ na rezultaty modelowania metodą QSAR/QSPR ma zebranie w pierwszym etapie dobrej jakości danych eksperymentalnych. W kolejnym etapie procedury QSAR/QSPR oblicza się tzw. deskryptory fizykochemiczne. Następnie, dysponując dobrze wyznaczonymi danymi eksperymentalnymi oraz poprawnie wyznaczonymi deskryptorami, można uzyskać finalny model matematyczny QSAR/QSPR określający zależność pomiędzy deskryptorami poszczególnych związków a ich aktywnością biologiczną/właściwościami fizykochemicznymi. Istnieje wiele metod chemometrycznych do uzyskania takich modeli, począwszy od najprostszych modeli regresji prostej aż po bardziej skomplikowane metody regresji wielokrotnej, np. metoda głównych składowych (PCA) oraz częściowych najmniejszych kwadratów i ich warianty oraz sztuczne sieci neuronowe i algorytmy genetyczne.

Praca mgr Urszuli Anny Judyckiej, wykonana w Katedrze Chemii Fizycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, dotyczy określenia relacji aktywność biologiczna-właściwości fizykochemiczne dla 40 wybranych związków amfolytycznych (zdolnych do reakcji z kwasami i zasadami), wykazujących aktywność biologiczną, a w wielu przypadkach aktywność terapeutyczną. Do badań Doktorantka wybrała związki posiadające różnorodne grupy funkcyjne, takie jak hydroksylowe, karboksylowe, sulfonowe, sulfonamidowe, aminowe i amidowe oraz struktury heterocykliczne zawierające atomy azotu. Taki wybór związków zapewnia możliwość znalezienia ogólnych zależności pomiędzy doświadczalnymi i obliczeniowymi cechami i właściwościami fizykochemicznymi a ich cechami biologicznymi i farmaceutycznymi. Realizując postawiony cel Doktorantka najpierw wyznaczyła dla tych związków eksperymentalnie dane spektralne (widma) i wybrane parametry chromatograficzne (współczynniki retencji), a następnie zastosowała wiarygodne metody chemometryczne do znalezienia zależności matematycznych określających te zależności. Podjęcie badań mających na celu znalezienie takich zależności należy uznać za bardzo aktualne zagadnienie i wychodzące naprzeciw licznym zapotrzebowaniom w projektowaniu leków.

Przedstawiona do recenzji zasadnicza część pracy obejmuje 104 strony maszynopisu. Cała rozprawa ma układ coraz częściej spotykany dla tego typu prac, czyli obszerną część teoretyczną (58 stron) i skróconą część eksperymentalną (12 stron) oraz komentarz wraz z dyskusją (11 stron), zakończoną 1,5 stronicowymi wnioskami do uzyskanych danych w opublikowanych już pracach. Na końcu Autorka umieściła wykaz – moim zdaniem zbyt bogato cytowanej literatury (338 pozycji) – oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. W tekście znajdują się 2 tabele, 3 fotografie i 7 rysunków.

Egzemplarz całego opracowania zawiera również oświadczenia wszystkich współautorów prac będących przedmiotem rozprawy oraz kserokopie czterech prac, będących podstawą rozprawy wraz z czterema suplementami.

W części teoretycznej Doktorantka przedstawiła z dużą znajomością zagadnienia związane z tematyką realizowanej pracy, a mianowicie scharakteryzowała metody doświadczalne często stosowane w metodologii QSPR/QSAR (metody chromatograficzne i spektroskopowe) i metody nieempiryczne stosowane w analizie zależności struktura-aktywność. Ważnym elementem części teoretycznej jest obszerna charakterystyka metod regresji, zwykle wieloparametrycznych, stosowanych w badaniach zależności struktura-aktywność. Lektura części literaturowej wskazuje, że Doktorantka bardzo dobrze przygotowała się do realizacji postawionego problemu badawczego.

W podrozdziale *Cel pracy* Doktorantka przedstawiła program badań, który najogólniej obejmował otrzymanie potwierdzonych chemometrycznie zależności między parametrami retencji w układach RP-HPLC czterdziestu związków o różnej strukturze chemicznej i o zbliżonym działaniu farmakologicznym, a nieempirycznymi parametrami charakteryzującymi ich budowę chemiczną, a także ich właściwościami spektroskopowymi w zakresie UV. Warto podkreślić dbałość o dobór parametrów doświadczalnych mających charakteryzować różne środowiska biologiczne. Analizy chromatograficzne prowadzone były z wykorzystaniem faz ruchomych o wartościach pH zbliżonych do kwasowości różnych fragmentów przewodu pokarmowego – żołądka (pH=2), jelit (pH=7) i dwunastnicy (pH=1). Ważnym celem badań było również znalezienie cech wspólnych, jak i różnicujących badane związki chemiczne, zarówno pod względem fizykochemicznym jak i aktywności biologicznej.

Dogłębna analiza przedstawionej rozprawy wskazuje na duży wkład pracy włożony przez Doktorantkę i na wszechstronność przeprowadzonych badań (spektroskopia w zakresie UV, wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych, różnorodne techniki chemometryczne). Podstawą rozprawy doktorskiej są cztery wieloautorskie prace opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (*Spectrochimica Acta A*, *Journal of Chromatography B*, *Structural Chemistry*, *Chemical Physics Letters*). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką, a z załączonych oświadczeń wynika, że Jej wkład pracy był dominujący (60-70%) i dotyczył samodzielnego wykonania wszystkich eksperymentów (spektralnych i chromatograficznych) i obliczenia wszystkich deskryptorów oraz ich przygotowania do analiz chemometrycznych.

Na podstawie oceny uzyskanych wyników uważam, że główne cele pracy zostały osiągnięte, a najistotniejsze osiągnięcia Doktorantki to:

1. wyznaczenie trzech równań liniowych, będących modelami zależności między logarytmem wartości energii długofalowych pasm absorpcji w roztworach

wodnych i w metanolu a wartościami parametrów fizykochemicznych, charakteryzujących cechy globalne oraz cechy elektronowe (elektrofilowe lub nukleynowe) badanych związków;

2. wyznaczenie metodą RP-HPLC parametrów retencji ($\log k_w$) dla wszystkich badanych związków na trzech polarnych i sześciu niepolarnych kolumnach, przy różnych wartościach pH faz ruchomych;

3. znalezienie sześciu równań analitycznych określających relacje między parametrami retencji ($\log k_w$) a wartościami charakteryzującymi zachowanie badanych związków w układzie n-oktanol/woda, przy różnych wartościach pH charakterystycznych dla układu pokarmowego;

4. znalezienie modelu matematycznego zawierającego 19 deskryptorów charakteryzujących właściwości globalne, cechy elektronowe i charakterystyki spektralne, umożliwiającego klasyfikację badanych związków, pod kątem zróżnicowanych cech terapeutycznych (oddziaływania na układ nerwowy lub na organizmy patogenne).

Uzyskane przez Doktorantkę rezultaty są ponadto potwierdzeniem, że metody chemometryczne są użytecznym narzędziem w określaniu relacji między wyznaczonymi doświadczalnie charakterystykami spektralnymi lub chromatograficznymi a parametrami fizykochemicznymi w kontekście określenia ich aktywności biologicznej oraz zdolności terapeutycznej. Podkreśla to wyraźnie aplikacyjny charakter pracy. Znalezione modele umożliwiają bowiem bez przeprowadzania czasochłonnych eksperymentów: przewidywanie charakterystyk spektralnych dla nieznanymi związków; przewidywanie parametrów retencji/współczynników podziału n-oktanol/woda dla niezbadanych związków, pod warunkiem, że związki te wykazują podobieństwo strukturalne lub podobne zachowanie.

Obowiązkiem recenzenta jest także wskazanie ewentualnych niedoskonałości czy błędów. Generalnie pracę czyta się dosyć trudno, głównie ze względu na brak wykazu skrótów, których w pracy jest stosunkowo dużo i nie zawsze jednoznacznych terminów czy symboli wyznaczanych parametrów. Konieczne jest ciągle odwoływanie się do prac oryginalnych, przykładowo w części opisowej przydatny byłby np. tabelaryzowany wykaz wszystkich deskryptorów, taki jaki został zamieszczony w tabeli 38, w materiale dodatkowym do jednej z publikacji. W części autorskiej zamieszczony jest wykaz wszystkich badanych związków (nazwa w języku angielskim, struktura, źródło uzyskania). Sądzę, że nazwy stosowanych związków (tab. 1, s. 62-65) powinny być podane w języku polskim. Innym przykładem nadużywania terminologii angielskiej jest termin „rotometr” (s. 27). Z kolei niewielka liczba literówek świadczy o staranności przygotowania manuskryptu.

Chciałbym też zwrócić uwagę na kilka niezręcznych bądź zbyt literackich sformułowań i niewłaściwych/niejednoznacznych terminologii.

NieZRęczne sformułowania:

1. „analiza na gruncie obliczeniowym” (w tytule rozprawy i na s.75),
2. „skład miejsc podziałowych w żywym organizmie” (s. 8),
3. „rysuje to perspektywy” (s. 8),
4. „snuć przewidywania” s. 81,
5. „pokaźna liczba pasm” (s. 17),
6. „wyłuskanie informacji” (s. 61 i 85),
7. „część parametrów uzyskano” (s. 74),
8. „silnie kwasowa faza stacjonarna” (s. 43),
9. „chemometryczne spojrzenie na korelacje” (s.82).

Błędne lub niejednoznaczne terminy

1. „dziesiąty molowy współczynnik absorpcji” (s.15),
2. „odwrotny układ faz, układ odwróconych faz” (s. 69),
3. w pracy stosowane są różne terminy retencyjne, a chodzi o współczynnik retencji k , (współczynnik k , s. 32, współczynniki rozdzielenia chromatograficznego, s. 5, współczynniki pojemnościowe k' , s. 5 i 71, współczynnik retencji, s. 18, parametr retencji k_w , s.80,
4. wskaźnik Kovats'a zamiast indeks Kovats'a , (s. 5).

Z kolei odnośnie zagadnień merytorycznych chciałbym zapytać o następujące kwestie:

1. Jak należy rozumieć termin „szybkość reakcji” we fragmencie dotyczącym parametrów retencyjnych (s. 19) tym bardziej, że symbol „ k ” w pracy oznacza współczynnik retencji?
2. Jak należy rozumieć termin „roztwór adsorbentów” (s. 28)?
2. Czy prawdziwe jest stwierdzenie, że podczas eksperymentu chromatograficznego warunki są niezmiennie (s. 28)?
3. Jak należy rozumieć rozstęp parametru retencji dla różnych kolumn (s. 83)?
4. Co oznacza „objętość mieszania aparatu” (s. 35)?
5. Czy poprawne jest stwierdzenie, że polarność analitu wpływa na geometrię związku (s.36)?
5. Czy poprawny jest skrót deskryptora S (s. 87)?

Wspomniane wyżej uwagi i zapytania uważam za drugo- i trzeciorzędne i nie mające wpływu na moją pozytywną merytoryczną ocenę pracy. Jestem przekonany, że zostaną one wyjaśnione podczas publicznej obrony rozprawy.

Wniosek końcowy:

Na podstawie analizy przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej Urszuli Anny Judyckiej mogę jednoznacznie stwierdzić, że zawiera ona **elementy nowości naukowej** a

podjęte badania mają charakter innowacyjny. Dotyczą one wzbogacenia wiedzy z zakresu poszukiwania relacji między wielkościami wyznaczonymi doświadczalnie dla szerokiej gamy związków (w tym przypadku pomiarami spektralnymi i chromatograficznymi), a określonymi obliczeniowo deskryptorami fizykochemicznymi (metodami chemii kwantowej i w oparciu o zależności empiryczne) oraz wszechstronnej analizy chemometrycznej mającej dla celu rozróżnianie związków pod kątem ich cech biologicznych.

Uzyskane rezultaty przedstawione w rozprawie wskazują, że mgr Urszula Judycka opanowała zarówno metody prowadzenia badań doświadczalnych - spektralnych i chromatograficznych - jak i techniki chemii obliczeniowej i chemometrii oraz opracowywania wyników oraz ich przedstawiania. Muszę przyznać, że Doktorantka podjęła się ambitnego zadania, któremu w dużej mierze sprostała gromadząc bogato udokumentowany materiał doświadczalny. Pozytywnie należy ocenić również ogólny dorobek Kandydatki, który obejmuje współautorstwo 6 prac opublikowanych w czasopiśmie z bazy Web of Science, 1 pracy polskojęzycznej oraz 2 prezentacji seminaryjnych.

Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że w świetle **Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14.03. 2003 r., (Dz. U. nr 65, poz. 595 z 2003 r., ze zm. w Dz. U. z 2005 r. nr 164, poz.1365)** recenzowane opracowanie **spełnia wymogi** stawiane tego typu pracom i dlatego wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Urszuli Anny Judyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 31.03.2019

