UNIWERSYTET OPOLSKI

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45–052, Opole
tel. 077 452 71 00
fax 077 452 71 01
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. zw. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

Opole, 2016-08-24

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana mgra Łukasza Kubika

zatytułowanej

„Modelowanie zależności pomiędzy strukturą i retencją chromatograficzną związków dysocjujących"

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Kubika, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Pawła Wiczlinga, są zagadnienia związane wyznaczaniem właściwości fizykochemicznych związków organicznych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a na tej podstawie opracowania zależności struktura-retencja (modeli QSRR) pozwalających obliczanie czasów retencji oraz na przewidywanie zachowania się cząsteczek w organizmie, czyli ich potencjalnej aktywności biologicznej.

Stale rosnąca długość życia człowieka i związany z tym dłuższy okres aktywności społecznej i zawodowej a także stres związany z rosnącym tempem życia, skutkuje pojawianiem się wielu chorób. Wiąże się z tym konieczność przeciwdziałania pojawiającym problemom zdrowotnym i rozwoju nauk medycznych oraz poszukiwania nowych skuteczniejszych leków. Stale zatem poszukuje się nowych leków syntezując tysiące związków organicznych na przykład z wykorzystaniem metod chemii kombinatoryjnej. Wybór związków o potencjalnej aktywności biologicznej i poddanie ich badaniom klinicznym wymaga przeprowadzenia szeregu kosztownych i pracochłonnych badań wstępnych, pozwalających na przewidywanie zachowania się cząsteczki w organizmie. Znajomość takich właściwości fizykochemicznych jak stała dysocjacji (pK_a) czy lipofilowość ($\log P$) pozwala przewidywać zachowanie się cząsteczki w organizmie i odrzucenie już na

Wydział Farmaceutyczny z OML GUMed
DZIEKANAT
Wpłynęło dnia 6.9.2016
Liczba dziennika

wstępnym etapie badań związków o niepożądanych właściwościach. Właściwości te są bezpośrednio zależne od struktury danej cząsteczki, dlatego też od wielu lat badane są zależności pomiędzy strukturą chemiczną cząsteczek a właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością biologiczną. Zarówno stała dysocjacji (pK_a) jak i lipofilowość ($\log P$) powiązane z właściwościami farmakokinetycznymi związków dysocjujących mogą być wyznaczane zarówno metodami eksperymentalnymi jak i obliczeniowymi. Szybkie i dokładne oznaczenie tych parametrów pozwala na wstępną selekcję potencjalnych leków, a tym samym znacznie obniża koszty badań. Do eksperymentalnego wyznaczania właściwości fizykochemicznych stosowanych jest wiele metod, w tym metody chromatograficzne, a szczególnie wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz, przy czym dotyczą one najczęściej pojedynczych substancji. Metoda ta zastosowana została do oznaczania lipofilowości i pK_a, a przykładem tego może być wyznaczanie chromatograficznego Indeksu Hydrofobowości (CHI). Natomiast badania dotyczące ilościowej zależności pomiędzy strukturą substancji i retencją (QSRR) zapoczątkowane zostały w drugiej połowie lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku przez prof. Romana Kaliszana i są do tej pory z powodzeniem rozwijane w Jego zespole i przez Jego uczniów.

Dlatego też zrozumiałym jest fakt, że rozprawa doktorska Pana mgra Łukasza Kubika wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Wiczlinga, ucznia Profesora Kaliszana, dotyczy badań zależności pomiędzy strukturą i retencją chromatograficzną związków jonizujących i było, zdaniem recenzenta, jak najbardziej uzasadnione zarówno ze względów poznawczych, jak i praktycznych.

Oceniana rozprawa posiada strukturę mieszaną. Zasadnicza jej część została napisana w klasycznym układzie rozdziałów i zawiera wszystkie elementy cechujące bardzo dobrze przygotowaną i napisaną rozprawę doktorską. Integralną część rozprawy, zgodnie z przepisami opublikowanymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2 stanowi spójny tematycznie zbiór 4 artykułów opublikowanych w prestiżowych międzynarodowych wysokim współczynniku oddziaływania (IF) przedstawiony w Suplemencie B, w którym zamieszczono również oświadczenia określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów publikacji.

Przedstawiona do oceny praca składa się z wykazu skrótów i symboli, streszczeń w języku polskim i angielskim, listy publikacji, części teoretycznej, celu pracy, metodyki,

przedstawienia wyników oraz dyskusji wyników i konkluzji, bibliografii oraz Suplementu A zawierającego spis badanych związków i tabele z wynikami, wreszcie wymienionego wyżej Suplementu B. W spisie publikacji podane są również informacje bibliometryczne, czyli współczynniki oddziaływania i cytowania publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej. Sumaryczny IF publikacji jest bardzo wysoki i wynosi 13,114, co daje prawie 3,3 na 1 pracę, a liczba cytowań wynosi 15.

Część teoretyczna to omówienie literatury przedmiotu zawierające krótki wstęp, omówienie sposobu opisu dysocjacji w równaniach QSRR, lipofilowości i stałych dysocjacji oraz metod chemii obliczeniowej w tworzeniu modeli QSRR. Autor omawia w niej wpływ faz stacjonarnej i ruchomej (skład, pH) chromatografii cieczowej oraz budowy cząsteczki jonizującej i procesu dysocjacji na tworzenie tych równań. Następnie omawia zależności pomiędzy parametrami charakteryzującymi układ chromatograficzny i parametrami analitu. Wreszcie krótko przedstawia metody chemii obliczeniowej użyteczne w tworzeniu modeli QSRR. Treści zawarte w tej części rozprawy podane są we właściwych proporcjach i są zgodne z zakresem podjętych badań. Zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim ta część pracy świadczy o trafnym doborze treści i nie budzi zastrzeżeń. Część literaturowa poparta jest dobrze dobranymi cytacjami z literatury.

Następnie Autor przedstawia cel pracy, którym określa jako wyznaczenie prostych modeli QSRR na podstawie różnorodnej grupy wybranych związków chemicznych z uwzględnieniem procesu dysocjacji analitów.

W części pracy zatytułowanej „Metodyka" mgr Ł. Kubik przedstawia tylko sposób wykonania eksperymentów głównych przeprowadzonych za pomocą RP HPLC z detekcją ESI TOF MS (publikacje III i IV Suplementu B). Doświadczenia wstępne opisane są natomiast tylko w publikacjach I i II Suplementu B. Przedstawia wykorzystywane w badaniach odczynniki, warunki prowadzenia analiz chromatograficznych, sposoby przygotowania próbek i buforów oraz sposoby obliczania parametrów chromatograficznych. Następnie omawia modelowanie molekularne i rodzaje używanych do tego celu programów obliczeniowych. Wreszcie przedstawia trzy techniki regresji wykorzystane w analizie statystycznej do wyznaczenia zależności pomiędzy deskryptorami strukturalnymi i danymi eksperymentalnymi.

Kolejna część pracy zawiera otrzymane wyniki wraz z ich dyskusją. Przy czym w tej części nie omówiono wyników badań wstępnych opisanych w publikacjach I i II. W ramach badań wstępnych pracy testowano i optymalizowano bowiem opracowaną w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki GUM metodę wyznaczania, ze współczynnika retencji dla czystej wody jako eluenta, chromatograficznej miary hydrofobowości ($\log k_w$), stałej dysocjacji (pK_a) oraz współczynnika nachylenia z równania Syndera-Soczewińskiego (S) wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP HPLC). W pierwszy etapie wykorzystano technikę RP HPLC z detektorem DAD dla mieszaniny 26 pochodnych imidazoliny, czyli stosunkowo małej grupy związków. Wykorzystując opracowaną przez R. Kaliszana i P. Wiczlinga metodę wyznaczania eksperymentalnych wartości lipofilowości i stałej dysocjacji z zastosowaniem w RP HPLC elucji gradientowej pH/modyfikator organiczny (metanol) zastosowano do wyznaczenia tych wartości dla serii pochodnych imidazoliny. Otrzymane wartości dobrze korelowały z danymi teoretycznymi. Wykazano zatem, że metoda ta może być zastosowana do wstępnego określania właściwości farmakokinetycznych potencjalnych leków występujących w mieszaninie (publikacja I). Następnie metodę tę zastosowano do większej liczby mieszaniny 40 związków. Natomiast zastosowanie detekcji ESI TOF MS umożliwiło określenie tych właściwości oraz identyfikację pojedynczych związków występujących nawet w mieszaninie 100 różnych substancji. Wykazano, że po zastosowaniu kalibracji, wyznaczone wartości $\log k_w$ odpowiadają wartościom $\log P$ wyznaczanej dla standardowego układu oktanol-woda, a $pK_{a,chrom}$ wartościom pK_a w roztworze wodnym. Świadczy to o tym, że metoda ta jest użyteczna dla wstępnego wyznaczania ważnych farmakokinetycznie właściwości potencjalnych leków występujących w złożonych mieszaninach.

Po wymienionych wyżej badaniach wstępnych mgr Łukasz Kubik zastosował tę technikę (RP HPLC z detekcją ESI TOF MS) do oznaczania i określania właściwości mieszaniny 161 substancji chemicznych, zróżnicowanych strukturalnie, w tym 25% z nich to kwasy, 55% zasady oraz 20% związków o charakterze neutralnym. Spośród tych związków z powodzeniem udało się zidentyfikować 140. Pozostałych nie zidentyfikowano ze względu na elucję razem z czasem martwym, problemy z detekcją, czy też takie same masy molowe czyli nierozróżnialność za pomocą detekcji MS. W wyniku przeprowadzonych badań wykazał, że ograniczeniem zaproponowanej metody są warunki prowadzenia eksperymentu. Zatem metoda ta nie może być stosowana dla silnie hydrofilowych związków ($\log P_{N,chrom} < 0,5$) oraz

dla związków o $pK_{a,chrom}$ poza zakresem pH eksperymentu (2,5-10,5). W celu konwersji otrzymanych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej wartości fizykochemicznych i porównania z wartościami literaturowymi wykonał kalibrację z wybranymi pięcioma kwasami i pięcioma zasadami i wyznaczył równanie, pozwalające oszacować zarówno wartości $pK_{a,chrom}$, jak i $\log P_{N,chrom}$ dla pozostałych związków. Następnie, w oparciu o deskryptory strukturalne otrzymane za pomocą modelowania molekularnego, opracował uniwersalne równania QSRR dla poszczególnych parametrów, czyli $\log k_w$, pK_a i parametru S, badanych związków z uwzględnieniem ich jonizacji. Obliczenia te wykonał wykorzystując trzy różne metody regresji (Lasso, łączonej techniki Lasso/regresja krokowa i PLSR). W konkluzji stwierdził, że równania te nie zawsze posiadają dobre zdolności predykcyjne, jednak kombinacja danych otrzymanych przez modele QSRR w połączeniu z wynikami doświadczeń chromatograficznych pozwala na znaczna poprawę właściwości predykcyjnych równań. W celach porównawczych obliczył również wartości tych parametrów wykorzystując proste deskryptory z oprogramowania ACD/Labs. Tak opracowane modele matematyczne pozwoliły, na podstawie struktury chemicznej cząsteczki, na przewidywanie parametrów fizykochemicznych analitów i na tej podstawie ich czasów retencję w układzie chromatograficznym. Stwierdza w konkluzji, że przewidywanie czasów retencji na podstawie obliczonych z wykorzystaniem deskryptorów strukturalnych wartości wymienionych parametrów jest obarczone dużym błędem. Możliwe jest jednak znaczne poprawienie zdolności przewidywania opracowanego modelu QSRR przez połączenie ich z danymi uzyskanymi w eksperymentach wstępnych.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących zarówno samej rozprawy, jak i merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej renomie. Niemniej jednak ma jedną uwagę do dyskusji:

- Dlaczego Autor zdecydował się na przedstawienie głównego zakresu badań w formie opracowania mającego charakter dysertacji i w zasadzie powtórzył wyniki opisane w publikacjach III i IV, natomiast tak zwane badania wstępne, zawarte w publikacjach I i II zupełnie w tej dysertacji pominął ? Przecież można było w tej sytuacji napisać tylko krótki „Autoreferat", lub też opisać całość w formie dysertacji.

Na podstawie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy przypuszczam, że Doktorant sprawnie posługuje się językiem angielskim. Na uwagę zasługuje fakt, iż Autoreferat jest bardzo dobrze napisany i zawiera tylko nieliczne drobne błędy. Te, które znalazłem wymieniam poniżej:

- str. 48 i 59; „własności", chociaż w wielu innych przypadkach Autor używa prawidłowego określenia „właściwości"

- str. 59; „... umożliwiające oznaczenia bardzo hydrofobowych.....substancji, ...", a powinno być „...umożliwiające oznaczenie bardzo hydrofilowych...substancji"

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Łukasz Kubik wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia interesujących badań naukowych i wniósł istotny wkład w rozwój badań nad modelowaniem zależności pomiędzy strukturą związków i retencją chromatograficzną (QSRR), a opracowane modele matematyczne powalają przewidywać właściwości fizykochemiczne analitów i na tej podstawie retencję w układach chromatograficznych. Po zapoznaniu się z rozprawą mgra Łukasza Kubika **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w *Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych* rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

P. Wróżond