



Wrocław, 12. 09. 2022 r.

dr hab. Jarosław J. Panek, prof. UWr
Zespół Badawczy Struktury i Dynamiki Makroukładów
Wydział Chemii UWr

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Natalii Mech-Wardy
pt. „Badania *in silico* zależności struktura – aktywność
wybranych związków *N*-heterocyklicznych”**

Działając na podstawie powołania mnie 6 lipca 2022 przez Radę Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Natalii Mech-Wardy, przedkładam poniższą recenzję tej rozprawy, sporządzonej przez Doktorantkę pod opieką naukową promotor, Pani dr hab. Agnieszki Chylewskiej, prof. UG, w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa ma formę monografii naukowej, co wymaga większego nakładu pracy, ale daje też Autorce większe możliwości omówienia wyników niż forma zbioru powiązanych tematycznie artykułów, również dopuszczalna przez Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 r. (dalej: Ustawa). Rozprawa liczy 127 stron, z czego 86 stron to właściwa treść rozprawy, po której następują spis literatury (133 pozycje), zestawienie dorobku naukowego Doktorantki, załączniki (tabelaryczne przedstawienie wyników obliczeń) i streszczenie. Zgodnie z Ustawą (art. 187 ust. 1-3) zadaniem rozprawy jest przedstawienie ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, zaś jej przedmiotem jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W poprzednim zdaniu wybrałem z szerszych sformułowań Ustawy te przesłanki, które według mnie zachodzą i – zgodnie z poniższym uzasadnieniem – pozwolą mi w zakończeniu recenzji na jednoznacznie pozytywną konkluzję dotyczącą dopuszczenia Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska dotyczy obliczeniowego badania właściwości molekularnych czterech heterocyklicznych, aromatycznych amin i oddziaływania tych związków z modelem DNA. Cel moim zdaniem nadrzędny to oszacowanie powinowactwa badanych pochodnych do DNA, a stąd – będąca już poza ramami badawczymi rozprawy – racjonalna analiza możliwej kancerogenności amin. Skoro wiele takich połączeń powstaje w trakcie obróbki termicznej żywności, nie mamy większej kontroli nad tym, jakie konkretnie związki dostają się do naszego organizmu, więc tym bardziej warto zbadać możliwe oddziaływania szerokiej klasy amin heterocyklicznych z DNA. Temat badań jest ważny społecznie i jego podjęcie jest bardzo dobrą decyzją Promotor i Doktorantki. Wstęp pracy dobrze uzasadnia znaczenie biochemiczne pirazyny i sulfonamidów, układów macierzystych dla związków wybranych do szczegółowego zbadania. Autorka właściwie rozpoznaje też we wstępie rolę tautomerii dla zmienności struktury molekularnej i oddziaływań międzycząsteczkowych, co rzutuje na



metodologię dalszej pracy – dużą uwagę poświęcono właśnie względnym energiom form tautomerycznych. Opis fizykochemiczny samych amin przeprowadzono na poziomie teorii funkcjonału gęstości, co jest wystarczające dla potrzeb badań biochemicznych, w których większe modele oddziaływań małych cząsteczek z makromolekułami są poza zasięgiem metod korelacyjnych post-HF, np. rachunku zaburzeń MP2 (taka sytuacja dla wybranych układów nie zachodzi, nie są one zbyt duże, i zasadniczo mogłoby być korzystne sprawdzenie metodą MP2 trafności przewidywań względnej energii tautomerów przez teorię DFT, choćby dla wybranej serii). Podsumowując fragment recenzji dotyczący wyboru tematu i ogólnego schematu przeprowadzenia badań stwierdzam, że oba te elementy oceniam pozytywnie.

Merytoryczną ocenę pracy rozpocznę zauważeniem, że wybrane do badań cztery związki należą do dwóch grup: pochodnych pirazyny oraz sulfonamidów. Zróżnicowanie natury tych związków, w tym wielkości cząsteczek, sprawia, że trudno porównywać wprost ich właściwości, więc nie mam zastrzeżeń co do decyzji Autorki, by te dwie grupy pochodnych potraktować osobno. Jednakże – jak przyznaje Autorka – część badań jest kontynuacją wcześniejszych prac, co narzuciło wybór poziomu obliczeniowego wprowadzając pewną niespójność: jak podano na stronie 35, cząsteczki mniejsze (2-hydrazynopirazyna i 2-chloro-3-hydrazynopirazyna) badano na poziomie B3LYP/6-311+G(d,p), a większe – sulfonamidy – na poziomie M06/6-311++G(2d,2p), czyli z większą bazą funkcyjną. Mam tutaj pytanie – dlaczego cząsteczki mniejsze opisane są mniejszą bazą? Czy jest to skutek wykonywania badań w określonej sekwencji (małe cząsteczki – wcześniej, zanim pojawiła się konieczność dopasowania się w drugiej serii badań do wcześniejszych prac Katedry Chemii Bionieorganicznej)? Co więcej, wyznaczenie logP dla pochodnych pirazyny obejmuje m.in. dodatkowe optymalizacje na poziomach PCM/B3LYP/6-311+G(d,p) oraz SMD/M06-2X/6-311+G(d,p) (vide str.37 i 63), czyli wprowadzony jest kolejny funkcjonał, M06-2X, i to połączony z innym modelem rozpuszczalnikowym (SMD, a nie PCM). Gdyby sprawdzone zostały cztery możliwe kombinacje (PCM/B3LYP, SMD/B3LYP, PCM/M06-2X i SMD/M06-2X), być może ujawniłyby się charakterystyczne cechy modelu SMD albo funkcjonału M06-2X. Przedstawione uwagi nie są zarzutami w sensie metodologii – dla teorii DFT już najmniejsza z zastosowanych baz, 6-311+G(d,p), powinna dawać wyniki bliskie nasyceniu – choć najlepiej byłoby utrzymać jednolity poziom obliczeniowy w całej rozprawie.

Bardzo dobrze oceniam starania Doktorantki mające na celu ustalenie relacji energetycznych dla możliwych tautomerów i struktur jonowych badanych związków. To kwestia ważna z punktu widzenia biochemii i może pomóc w analizie doświadczeń potencjometrycznych. Równie ważne jest zbadanie barier konformacyjnych i wyznaczenie konformerów. Mam tutaj pytanie dotyczące profili energetycznych z rysunków 14 i 15 (str. 42). Te profile wyznaczono bardzo starannie, bo z krokiem kąta dwuściennego jedynie 1°, jednak występują na nich nieciągłości przebiegu krzywej – na prawo od szczytów barier następuje gwałtowny spadek energii. Taki efekt może być wynikiem tego, że przeszukując hiperpowierzchnię energii potencjalnej w jednym wymiarze (zadany kąt dwuścienny)



nieświadomie „pchamy pod górę” wartości innych współrzędnych wewnętrznych będących poza naszą kontrolą narzuconą więzami, aż w pewnym momencie siły działające na atomy powodują nagłą zmianę tych innych współrzędnych i nagły spadek energii. Przykładem może być rotacja jednej grupy funkcyjnej, która powoduje steryczny kontakt atomów tej grupy z inną. Dopóki nie pokonamy bariery na rotację tej drugiej grupy, rotacja pierwszej grupy napotyka opór. Taka sytuacja jest możliwa do zaobserwowania przy podglądzie procesu skanowania w programach typu MOLDEN. Mam zatem kolejne pytanie – czy taki efekt zaobserwowano, a jeśli tak, to jaka była przyczyna przeszacowania bariery konformacyjnej?

Dla obu serii związków wyznaczono także stałe dysocjacji kwasowo-zasadowej korzystając z cyklu termodynamicznego Keitha i Carter. Uzyskane wyniki odtwarzają zbadane doświadczalnie trendy jakościowo, ale znacznie różnią się ilościowo od wartości eksperymentalnych – co najmniej o dwa rzędy wielkości, a czasem znacznie więcej (tabele 8 i 9, str. 64-65). Autorka prawidłowo interpretuje tę niezgodność jako wynik błędów przy szacowaniu energii swobodnej solwatacji – ciągłe modele rozpuszczalnikowe nie mogą uwzględnić takich kwestii jak reorganizacja cząsteczek rozpuszczalnika wokół polarnej albo naładowanej cząsteczki substancji rozpuszczonej. Znacznie dokładniejsze wydają się oszacowania współczynnika podziału n-oktanol / woda ($\log P$) dla pochodnych pirazyny (str. 65). Otrzymane wartości są ujemne wskazując na hydrofilowość obu badanych pochodnych. Wprowadzenie podstawnika $-Cl$ zmniejsza tę preferencję – $\log P$ rośnie. Wyniki modelu PCM i SMD nie są ilościowo zgodne, bo PCM przewiduje jedynie niewielką utratę hydrofilowości po podstawieniu chlorem, o 0,1 jednostki $\log P$, zaś dla SMD zmiana jest o 0,9 jednostki. Autorka nie odwołuje się do danych doświadczalnych (również ich nie znalazłem), ale wydaje mi się, że w świetle kłopotów modeli teoretycznych z opisem wartości pK_a warto byłoby sprawdzić przynajmniej rząd wielkości $\log P$ obliczonego według popularnych algorytmów empirycznych, dostępnych online, np. w bazie PubChem czy serwerze MolInspiration. To drugie źródło podaje przewidywaną wartość $\log P$ dla związku 2HP równą -0,40, a dla 2Cl3HP równą 0,40 – różnica $\log P$ o 0,8 jest bardzo dobrze zgodna z modelem SMD.

Uwieńczeniem cyklu badań dla pierwszej klasy związków jest próba wyznaczenia miejsc wiązania się małych ligandów pirazynowych do podwójnej nici DNA. Zastosowany algorytm dokowania molekularnego jest właściwy do tego celu, oczywiście przy założeniu, że struktura cząsteczki-gospodarza pozostaje niezmienna przy wiązaniu liganda; Autorka jest świadoma tego ograniczenia i w jego ramach prawidłowo opisuje otrzymane struktury. Ciekawe i obrazowe jest podanie procentowych obsadzeń poszczególnych miejsc wiązających. Zastanawia mnie, czy dla badanych pochodnych pirazyny możliwy jest też również mechanizm interkalacji? Wprawdzie dokowanie utrzymujące strukturę cząsteczki gospodarza nie będzie w stanie tego sprawdzić, bo nie będzie możliwe odpowiednie rozsunięcie par czy inny sposób przygotowania luki, ale być może w trakcie przeszukiwań literaturowych Doktorantka zetknęła się z propozycją mechanizmu interkalacji dla podobnych związków.



Na zakończenie części merytorycznej recenzji chciałbym zauważyć, że tytuł pracy zapowiada nacisk na badania zależności struktura – aktywność, przez co najczęściej rozumie się aktywność biologiczną. Ten element jest w rozprawie obecny, ale nie dominujący – znacznie szerzej potraktowany jest rzetelny opis fizykochemiczny i energetyczny dla wybranych struktur. W tekście można w kilku miejscach znaleźć odniesienia do badań biologicznych wykonywanych przez współpracowników (np. przy dyskusji wyników dokowania molekularnego), ale rozprawa nie zawiera typowych dla analiz QSAR elementów: tworzenia i walidacji modeli matematycznych.

Przy przygotowywaniu dużego objętościowo tekstu praktycznie nie da się uniknąć pewnych drobnych nieścisłości czy omyłek. Poniżej wymieniam kilka, które napotkałem w tekście, zaznaczając jednak już w tym miejscu, że ich obecność w pracy nie zmniejsza mojego dobrego wrażenia z lektury rozprawy.

- Niektóre cytowania nie są właściwe, np. na str. 69 Autorka informuje o zbadaniu aktywności biologicznej pochodnych 2HP i 2Cl3HP, ale umieszczone w tym miejscu odnośniki [112, 113] dotyczą, według spisu literatury, innej tematyki.
- Na str. 32 wspomniany jest „komercyjnie dostępny program AutoDock 4.2” – według mej wiedzy AutoDock 4 jest dostępny swobodnie, wręcz na licencji GNU GPL, a przy wykorzystaniu komercyjnym donacje na rzecz grupy Olsons są jedynie sugerowane, a nie obowiązkowe.
- W podpisach rysunków obrazujących orbitale HOMO i LUMO (rys. 22-23, 25-26) Autorka stosuje skrót myślowy „ładunek dodatni” i „ładunek ujemny” – oczywiście chodzi o znak jednoelektronowej funkcji falowej (orbitalu Kohna-Shama), bo chmura elektronowa z natury rzeczy ma ładunek ujemny.
- Dokowanie wykonano dla modelu DNA ze strukturalnej bazy PDB (patrz str. 38), ale nie został podany czteroznakowy kod depozytu PDB, z którego pobrano tę strukturę. Nie została też podana wykorzystana sekwencja nukleotydów, więc nie wiemy, czy dokowanie mogło próbować odpowiednio szeroki zakres możliwych ułożeń par. Podpis rysunku 29 przedstawiającego struktury kompleksów pochodna pirazyny – DNA mówi o „znaczących odległościach”, ale raczej chodzi o „zaznaczone odległości”.

Przed podsumowaniem recenzji rozprawy doktorskiej chcę odnieść się pozytywnie do całokształtu dorobku naukowego Doktorantki. Jest ona współautorką sześciu artykułów w dobrych branżowych i ogólnochemicznych czasopismach (J. Phys. Chem. A oraz B, J. Mol. Liquids, RSC Advances, Polyhedron, Molecules), jedenastu komunikatów konferencyjnych i sześciu posterów, a także uczestniczyła w trzech projektach Badań Młodych Naukowców. Odbyła też trzymiesięczny staż (VU Amsterdam) w zespole prof. Celií Fonscea Guerra. Dwie z opublikowanych prac Doktorantki dotyczą bezpośrednio tematu pracy doktorskiej (grupa



pochodnych pirazyny), co jest świadectwem zewnętrznego uznania dla tej linii badawczej oraz pozytywnej oceny wyników przez recenzentów w procesie wydawniczym.

Podsumowując swoją recenzję chcę podkreślić, że wszelkie umieszczone powyżej pytania czy krytyczne uwagi mają na celu zwrócenie uwagi Autorki na sprawy warte pogłębionej analizy w dalszych badaniach, natomiast sama **rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Mech-Wardy spełnia według mnie wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim**. Dowodzi nabycia przez Doktorantkę odpowiedniej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności zastosowania tej wiedzy przy rozwiązywaniu zagadnień badawczych. Przedstawiona mi rozprawa jest też oryginalnym, autorskim rozwiązaniem problemu naukowego – kwestii obliczeniowego wyznaczenia parametrów fizykochemicznych dla przedstawicieli dwóch rodzin amin. Ten cel oraz wynikające z niego cele cząstkowe został w mojej ocenie osiągnięty. Biorąc wszystkie wymienione elementy oceny pod uwagę, stwierdzam, że **rozprawę doktorską mgr Pauliny Mech-Wardy oceniam jednoznacznie pozytywnie i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego**.

dr hab. Jarosław J. Panek, prof. UWr