

prof. dr hab. Marzena Dzida
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Instytut Chemii
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice

Katowice, dnia 11 września 2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej Pana magistra Arkadiusza Nowickiego pt.:
„Wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej do wyznaczenia
lipofilowości wybranych związków”
wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska
Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem
dr. hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ

Lipofilowość jest deskryptorem molekularnym wyznaczanym w celu uzyskania informacji o bioaktywności substancji, pomocnym przy projektowaniu leków, ich biodostępności, a co za tym idzie pomocnym przy określeniu dawkowania i działania substancji leczniczych. Najczęściej wyznaczanym wskaźnikiem lipofilowości jest współczynnik podziału 1-oktanol/woda. Woda jest środowiskiem płynów ustrojowych. Natomiast 1-oktanol można traktować jako modelowy lipid, będący składnikiem błon komórkowych. Współczynnik podziału 1-oktanol/woda można wyznaczyć bezpośrednio metodą ekstrakcji ciecz-ciecz lub pośrednio stosując metody chromatograficzne. Recenzowana praca dotyczy badania lipofilowości dwudziestu nowo zsyntezowanych związków, w tym ośmiu pochodnych i analogów 2-tioakso-1,3-tiazolidyn-4-onu oraz dwunastu pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksyłowego. Autor dokonał wyboru takiego przedmiotu badań ponieważ związki o zbliżonej budowie są składnikami leków, a te z pierścieniem tiazolidynowym w cząsteczkach charakteryzują się aktywnością biologiczną po podaniu doustnym. Do wyznaczenia lipofilowości wybranych związków Doktorant wybrał chromatografię cienkowarstwową w odwróconym układzie faz oraz zastosował modele teoretyczne korzystając z dostępnych programów. Podjęty temat jest bardzo ważny, gdyż każda próba poszukiwania nowych leków obok znaczenia poznawczego ma istotne znaczenie użytkowe.

Formalna ocena rozprawy

Rozprawa doktorska mgr. Arkadiusza Nowickiego liczy 121 stron i zawiera kolejno: spis skrótów, akronimów i jednostek, cel pracy, część teoretyczną, część doświadczalną, podsumowanie i wnioski, bibliografię liczącą 126 pozycji, spis tabel, wykresów i rysunków oraz abstrakt w języku angielskim. Część teoretyczna została podzielona na pięć rozdziałów (Lipofilowość, Doświadczalne metody wyznaczania lipofilowości, Komputerowe metody wyznaczania lipofilowości, Właściwości chemiczne i fizykochemiczne związków biologicznie aktywnych, Tiazolidyna i rodanina). Część doświadczalna zawiera również pięć rozdziałów (Stosowany sprzęt laboratoryjny, odczynniki chemiczne i oprogramowanie, Obiekty badań, Przygotowanie odczynników, Procedura analityczna, Wyniki badań doświadczalnych). W pracy zabrakło mi rozdziału: Dyskusja uzyskanych wyników.

Należy tu wspomnieć, że wyniki zawarte w przedmiotowej rozprawie zostały opublikowane w dwóch pracach (pozycje [118] i [119]). Zatem dziwi fakt, że rozprawa nie została przygotowana na podstawie opublikowanych artykułów naukowych. Dziwi również fakt, że Doktorant nie cytuje swoich prac omawiając wyniki badań. Wyżej wymienione pozycje zacytowane zostały tylko w podrozdziale dotyczącym syntezy badanych związków.

Merytoryczna ocena pracy

Rozprawę rozpoczyna „Cel pracy”, który zawiera uzasadnienie wyboru przedmiotu badań, zwięzły opis zakresu badań oraz cel pracy. Celem pracy było zbadanie wpływu budowy badanych związków na ich potencjalną aktywność biologiczną i biodostępność w organizmie w oparciu o wyznaczoną lipofilowość, tak zwane właściwości fizykochemiczne oraz parametry bioaktywności. W rozdziale „Lipofilowość” Doktorant definiuje to pojęcie oraz opisuje w jaki sposób można określić ją w sposób ilościowy. Należy w tym miejscu pamiętać, że zgodnie z prawem podziału Nernsta, współczynnik podziału zależy od temperatury i ciśnienia. W kolejnym rozdziale „Doświadczalne metody wyznaczania lipofilowości” Autor skupił się na opisie metod ekstrakcyjnych oraz chromatograficznych. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że wadą metod ekstrakcyjnych jest „konieczność utrzymywania stałych warunków eksperymentalnych, gdyż różne warunki dają różne wartości $\log P$ dla tego samego związku.” (str: 15). Każde doświadczenie powinno być przeprowadzane w ściśle określonych warunkach w celu uzyskania wiarygodnych wyników. Ciekawe są metody wykorzystujące membrany dializacyjne. Doktorant wspomina w tym

miejscu o wykorzystaniu ultradźwięków. Interesujące byłoby nieco szersze omówienie tych metod. Z kolei przy opisie metod wykorzystujących nanocząstki, Doktorant wymienia, cytując: „*porowate nanocząstki magnetyczne otoczone krzemionką, które są wstępnie pokryte znaną ilością n-oktanolu*” (str. 17). Prosiłabym o podanie przykładów takich nanocząstek oraz wyjaśnienie co znaczy „*wstępnie pokryte*”. Kolejne podrozdziały Doktorant poświęcił metodom chromatograficznym ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz. Prosiłabym o wyjaśnienie co to znaczy standardowa procedura wyznaczania wartości $\log P$ zalecana przez OECD. W tej części pracy Doktorant nawiązuje do oddziaływań międzycząsteczkowych. Prosiłabym o uporządkowanie tego zagadnienia i uściślenie następujących stwierdzeń: „*...dzięki oddziaływaniom kowalencyjnym, hydrofobowym lub elektrostatycznym.*”, „*...lepiej naśladuje specyficzne interakcje...*”, „*...uwzględnia zarówno oddziaływania hydrofobowe jak i polarno-jonowe.*” (str. 20). W Tablicach 1 i 2, Doktorant podaje przykłady zastosowania odpowiednio chromatografii cieczowej i cienkowarstwowej do wyznaczania lipofilowości. Jakie było kryterium wyboru przykładów? Warto byłoby uściślić co znaczą np. „*leki przeciwdrgawkowe*”, „*seria związków pokrewnych farmaceutycznie*” (Tablica 1), „*4 pochodne betuliny*”, „*4 syntetyczne i 13 naturalnych substancji słodzących*” (Tablica 2). Obok metod doświadczalnych najczęściej wykorzystywanych do wyznaczania logarytmu współczynnika podziału, Doktorant opisał modele teoretyczne opierające się w najogólniejszym ujęciu na metodzie udziałów grupowych. Metoda ta wydaje się być prosta, wymaga jednak ostrożności przy podziale cząsteczki danego związku na odpowiednie fragmenty. Proszę o wyjaśnienie na czym polega różnica pomiędzy metodą miLogP a LogP_{ACD} oraz jak Autor poradził sobie z metodą XLOGP3 ? Proszę o wyjaśnienie, co znaczy, że AlogP jest wykorzystywany „*...do neutralnych związków organicznych...*” (str. 31)? W części teoretycznej Doktorant opisał również właściwości chemiczne i fizykochemiczne związków biologicznie aktywnych. Jednymi z kryteriów sformułowanych przez Lipinskiego i współpracowników, które przytacza Doktorant, są: „*liczba donorów wiązania wodorowego*” i „*liczba akceptorów wiązania wodorowego*”. Pojęcia „donor wiązania wodorowego” i „akceptor wiązania wodorowego” coraz częściej pojawiają się w literaturze przedmiotu. W mojej opinii nie są to jednak pojęcia ścisłe. Prosiłabym Doktoranta o odniesienie się do tej kwestii, również w kontekście pojęć zamieszczonych na Rysunku 12, ilustrującym trójkąt selektywności Snydera (str. 75). W tym rozdziale niezrozumiałe są dla mnie następujące fragmenty, cytując: „*...maskowanie polarnej cząsteczki hydroksylowej morfiny (dawcy wiązania wodorowego) grupami akceptującymi wiązanie wodorowe...*” (str. 35) oraz, cytując:



„W przypadku elastycznych cząsteczek leków, podczas wiązania następuje utrata entropii z powodu ograniczeń konformacyjnych...” (str. 36). Szkoda, że w tym rozdziale Doktorant nie opisał parametrów bioaktywności zamieszczonych między innymi w Tablicy 11 na str. 62. Ułatwiłoby to analizę uzyskanych przez Doktoranta wyników. Wstęp teoretyczny kończy rozdział poświęcony związkom będącym przedmiotem badań. Ciekawe są podrozdziały dotyczące tiazolidyny i rodaniny. Szkoda, jednak, że w Tablicach 4 i 5 nie zostały podane nazwy systematyczne tych związków. Ponadto, w tablicach tych brakuje temperatury dla jakiej podana została gęstość, a w przypadku temperatury wrzenia również ciśnienia. Natomiast w podrozdziale opisującym syntezę badanych związków brakuje informacji dotyczących warunków w jakich prowadzone były reakcje, odnośników literaturowych do tzw. „reakcji nazwiskowych” oraz charakterystyki otrzymanych związków. Równania reakcji zamieszczone na Rysunkach 10 i 11 są niekompletne. Wprawdzie można znaleźć odnośniki do prac współautorstwa Doktoranta, jednak w celu lepszej percepcji wyżej wymienione informacje powinny się znaleźć w tekście. Część doświadczalną rozpoczyna lista stosowanego sprzętu laboratoryjnego, odczynników chemicznych i oprogramowania. W tym rozdziale brakuje charakterystyki wykorzystywanych odczynników. Przedmiotem badań było dwadzieścia związków. Osiem z nich to pochodne lub analogi 2-tioksa-1,3-tiazolidyn-4-onu, natomiast dwanaście to pochodne kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego. W pracy nie znalazłam nazw badanych związków. Doktorant wykonywał analizy chromatograficzne z wykorzystaniem płytek chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi. Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny wody z metanolem, acetonitrylem, acetonem, propan-2-olem lub 1,4-dioksanem. Badania prowadzone były w temperaturze pokojowej. Proszę sprecyzować pojęcie „temperatura pokojowa”. Ostatni, najobszerniejszy rozdział części doświadczalnej, stanowi prezentacja wyników. Doktorant wyznaczył współczynniki opóźnienia. Szkoda, że Doktorant nie zamieścił zdjęć przykładowych chromatogramów. Następnie wyznaczył współczynniki retencji oraz chromatograficzne deskryptory lipofilowości. Brakuje tutaj Dodatku w którym Autor zamieściłby wyniki pozwalające na odtworzenie danych zawartych w Tablicach 8 i 15. Byłoby to jednocześnie rozszerzeniem tego co zostało już opublikowane (pozycje [118] i [119]). Zastrzeżenia budzi liczba cyfr znaczących parametrów zamieszczonych w wyżej wymienionych tablicach. Ponadto rząd wielkości „ $SD \alpha$ ” w dysertacji i w pracy [119] jest różny. W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” Doktorant pisze, cytując: „Dla wszystkich analizowanych związków dla zależności R_M w funkcji objętości rozpuszczalnika organicznego otrzymano wysokie, bliskie jedności, wartości



współczynnika kierunkowego prostej, co dowodzi liniowej zależności uzyskanych wyników” (str. 90). Proszę o wyjaśnienie tego stwierdzenia oraz porównanie ze stwierdzeniami zamieszczonymi na str. 56 i str. 57. Doktorant obliczył również wartości $\log P$, korzystając z dostępnych programów. Celem było sprawdzenie korelacji pomiędzy wartościami chromatograficznego deskryptora lipofilowości a teoretycznymi wartościami $\log P$. Zabrakło w tym miejscu informacji np. na jakie fragmenty zostały podzielone cząsteczki. Ciekawe byłoby przeprowadzenie krytycznej analizy wyników uzyskanych w oparciu o różne modele teoretyczne w kontekście założeń tych modeli. Bardzo pomocne są wykresy zależności chromatograficznego deskryptora lipofilowości od miLogP , które Autor przedstawił. Szkoda tylko, że nie zaznaczył słupków błędu. Na jakiej podstawie Doktorant przyjął kryteria dotyczące jakości otrzymanych korelacji (str. 65)? Ponadto korzystając z bazy danych Molinspiration Autor obliczył tak zwane parametry fizykochemiczne. Z Tablic 10 i 17 wynika, że wszystkie te wielkości są bezwymiarowe, co nie jest prawdą. Analizując uzyskane wyniki Doktorant napisał, że, cytując: „Wynika to z obecności wolnych atomów wodoru zdolnych do tworzenia tego typu oddziaływań” (str. 61). Proszę o wyjaśnienie tego stwierdzenia. Korzystając z bazy danych Molinspiration, Doktorant obliczył również parametry bioaktywności badanych związków. Czy budowa badanych związków sugeruje analizę pod tym kątem? Dla przykładu analizę ich potencjalnego oddziaływania na receptory jądrowe? Obok zawartych w rozprawie stwierdzeń o których będę chciała z Doktorantem podyskutować na obronie, w pracy można znaleźć nieco błędów stylistycznych i językowych. Dla przykładu, cytuję: „Spowodowane jest to wzrastającym powinowactwem substancji...” (str. 12), „interakcji” (w wielu miejscach pracy), „ilość” vs „liczba” (w wielu miejscach pracy), „addytywny charakter konstytutywny” (str. 30), „wartość współczynnika oktanol/woda” (str. 34), „frakcja objętościowa” (str. 53). W pracy można znaleźć również błędy typograficzne. Dla przykładu zaliczyłam do nich, cytując: „*n*-oktanol” i „oktanol” (w wielu miejscach pracy), „[BF₄]” (str. 26), „różnych” (str. 31), „mniejszą” (str. 35), „Caco-2” vs „Coca-2” (str. 36), „propanol” (Wykresy 3, 9, 15), „dioksan” (Wykresy 3, 9, 15), „Odległość wiąz.” (Wykres 3 i 9), „Parametrów” (Tablica 11), liczba miejsc po przecinku na skali osi rzędnych i odciętych (Wykresy 4-8 oraz 10-14).

Mimo uwag, należy podkreślić ogrom pracy jaki Doktorant włożył, aby dokonać analizy wpływu budowy badanych związków na ich właściwości istotne z punktu widzenia potencjalnego zastosowania jako substancji leczniczych oraz wzajemne zależności pomiędzy tymi właściwościami. Doktorant wykazał, w oparciu o wyniki badań doświadczalnych, że warunek Lipinskiego spełnia chromatograficzny deskryptor lipofilowości charakteryzujący pochodne lub

analogi 2-tiokso-1,3-tiazolidyn-4-onu, gdy fazę ruchomą stanowią mieszaniny wody z acetonitrylem lub propan-2-olem. Natomiast wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości, bliskie lub przekraczające wartość 5 charakteryzują tę grupę związków, gdy fazę ruchomą stanowią mieszaniny wody z acetonem, 1,4-dioksanem lub metanolem. W przypadku pochodnych kwasu 5-pirydylometylideno-3-rodaninokarboksylowego, najmniejsze wartości chromatograficznego deskryptora lipofilowości Doktorant uzyskał, gdy fazę ruchomą stanowiły mieszaniny wody z acetonitrylem lub propan-2-olem, pośrednie dla mieszanin wody z acetonem, a największe dla mieszanin wody z 1,4-dioksanem lub metanolem. Przy czym w przypadku tej grupy związków wartość 5 przekroczona została tylko dla siedmiu związków. Z kolei bazując na wynikach badań *in-silico*, otrzymanych z wykorzystaniem bazy Molinspiration, Autor pokazał, że właściwości wszystkich badanych związków spełniają regułę „pięciu” Lipińskiego oraz reguły Vebera. Zatem wykazał, że badane związki charakteryzują się potencjalnie dobrą biodostępnością w organizmie. Doktorant pokazał również, w oparciu o uzyskane wartości parametrów bioaktywności, że badane związki charakteryzują się umiarkowaną aktywnością w organizmie.

Zatem cel pracy został zrealizowany. A oceniana praca stanowi „...oryginalne rozwiązanie problemu naukowego...”, spełniając ustawowy wymóg stawiany pracom doktorskim.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr. Arkadiusza Nowickiego spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 ze zmianami). Wnoszę więc o dopuszczenie mgr. Arkadiusza Nowickiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Manuela Riolo