



Gdański Uniwersytet Medyczny
KATEDRA BIOFARMACJI
I FARMAKODYNAMIKI

Medical University of Gdańsk
DEPARTMENT OF BIOPHARMACEUTICS
AND PHARMACODYNAMICS

Prof. dr hab. dr h.c. Roman Kaliszan, czł. rzec. PAN

tel. (48)(58) 3491493 fax: (48)(58) 3491962

ul. Gen. J. Hallera 107, PL80-416 Gdańsk

e-mail: roman.kaliszan@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2015-03-12

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr. Łukasza Palkowskiego** pt. *Analiza zależności struktura, właściwości powierzchniowe i aktywność przeciwdrobnoustrojowa chlorków bis-imidazoliowych*

Obliczeniowa chemia leków, dziedzina współczesnych nauk farmaceutycznych, wiąże się się metodycznie z chemometrią. Chemometria jest dziedziną chemii, która rozwinęła się w ostatnim ćwierćwieczu XX wieku dzięki upowszechnieniu się w laboratoriach naukowych komputerów, co z kolei umożliwiło praktyczne wykorzystanie paradygmatów psychometrii, socjometrii i ekonometrii, sformułowanych w pierwszym ćwierćwieczu minionego wieku. Wtedy i później rozwinięte matematyczne metody przetwarzania wielowymiarowych zestawów danych, rozpropagowane przez chemometrię, pozwalają na „wyluskanie” z licznych i złożonych zbiorów danych maksimum istotnej, systemowej informacji o związkach, ich właściwościach i skutkach interakcji z otoczeniem. Obecnie, metody i procedury chemometryczne (w szczególności bioinformatyczne) są rutynowo wykorzystywane przy opracowywaniu różnorodnych danych eksperymentalnych. Często zresztą oprogramowanie chemometryczne wykorzystywane jest na zasadzie tzw. *czarnej skrzynki*, do predykcji właściwości fizykochemicznych i biologicznych istniejących bądź wirtualnych substancji. Czasem jednak wyprowadzone modele przydają się także do interpretacji sensu fizycznego uzyskanych wyników i racjonalnego projektowania dalszych eksperymentów. Można powiedzieć, że jest to „chemometria stosowana”, którą reprezentuje recenzowana praca doktorska.

Dysertacja doktorska Łukasza Palkowskiego, wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Jerzego Krysińskiego w Katedrze Technologii Postaci Leków Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, poza rozwiązaniem konkretnego farmaceutycznego celu aplikacyjnego, czyli zbudowaniem modelu umożliwiającego przewidywanie *a priori* właściwości przeciwbakteryjnych strukturalnie zdefiniowanych

chlorków bis-imidazoliowych, podejmuje też kwestie metodyczne z zakresu matematycznego modelowania zależności między strukturą chemiczną i wybranymi właściwościami fizykochemicznymi, a miarami aktywności biologicznej „kandydatów na leki”. Elementem nowatorskim jest w tym względzie zastosowanie oprogramowania jMAF opracowanego oryginalnie na Politechnice Poznańskiej na podstawie teorii zbiorów przybliżonych opartych na relacji dominacji (Dominance-based Rough Set Data Analysis – DRSA) Zdzisława Pawlaka.

Opublikowanie podstawowych tez pracy doktorskiej przez cenione międzynarodowe czasopismo o *Impact Factor* 2,507 (Pałkowski J., Błaszczński J., Skrzypczak A., Błaszczak J., Kozakowska K., Wróblewska J. Kozusko S., Gospodarek E., Krysiński J., Słowiński R.: „Antimicrobial activity and SAR study of new gemini imidazolium-based chlorides”, *Chemical Biology and Drug Design* 2014, **83**, 278-288), świadczy o dobrej randze naukowej prezentowanych badań i o tym, że oceny ekspertów światowej klasy poprzedzały moją recenzję. Ta świadomość pozwoliła mi skupić się na aspektach biologiczno-chemicznych dysertacji, warunkujących ubieganie się o stopień doktora nauk farmaceutycznych. Po zapoznaniu się z maszynopisem rozprawy, zredagowanym wyjątkowo starannie i z głębokim zrozumieniem przedstawianych treści, uznałem poprawność zastosowanej formalistyki matematycznej oraz biegłość Doktoranta w zakresie wykorzystania profesjonalnego oprogramowania do celów zaawansowanej statystyki i modelowania molekularnego.

Część teoretyczna recenzowanej pracy doktorskiej jest napisana w sposób bardzo skondensowany, a przy tym wyczerpujący. Na niespełna 20 stronach czytelnego wydruku Autor zamieścił niezbędne informacje o naturze chemicznej analizowanych surfaktantów, ich charakterystycznych właściwościach fizykochemicznych oraz biologicznych, a także w sposób zwięzły i zrozumiały przedstawił podstawy chemometrii i założenia matematycznej teorii zbiorów przybliżonych. Opis jest świetny stylistycznie i pozbawiony jakichkolwiek błędów. W całej pracy znalazłem tylko jedną minimalną usterkę wydruku: na stronie 10 w ostatnim wierszu jest zapis „stosowanie” zamiast „stosowania”.

Zwięźle i klarownie został przedstawiony cel pracy doktorskiej mgr. Łukasza Pałkowskiego. Jest to cel ważny naukowo-poznawczo a jego realizacja może mieć implikacje sanitarno-praktyczne. Doktorant postanowił opracować oparte o analizę QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) reguły decyzyjne umożliwiające racjonalne ukierunkowanie syntez nowych, lepszych środków dezynfekcyjnych/antyseptycznych z grupy kationowych związków powierzchniowo czynnych o strukturze chlorków bis-imidazoliowych. Można uznać, że w wyniku badań powstało narzędzie do przewidywania potencjału bakteriostatycznego „kandydatów na leki” z grupy pochodnych czwartorzędowych związków imidazoliowych, czyli do preselekcji związków na wstępnych etapach prac badawczo-rozwojowych nad nowymi

lekami. Na podstawie zależności występujących w regułach decyzyjnych, wartości współczynników konfirmacji atrybutów warunkowych oraz częstości występowania tych atrybutów warunkowych w regułach decyzyjnych, Autor uwieńczył swój doktorat projektem trzech najbardziej obiecujących leczniczo struktur chemicznych. Ich synteza i oznaczenie aktywności bakteriostatycznej przedstawia się jako niezwykle intrygujące wyzwanie naukowe w dalszej karierze akademickiej Doktoranta.

Realizacja celu pracy została prawidłowo zaplanowana. W pierwszej kolejności Autor skupił się na budowie bazy danych biologicznych i chemicznych wymaganych do opracowania wiarygodnych modeli predykcyjnych QSAR. Do badań zostały włączone dwie duże subserie czwartorzędowych chlorków bis-imidazoliowych (140 + 126 związków), zsyntezowanych i zbadanych fizykochemicznie (pomiar napięcia powierzchniowego) w Instytucie Technologii i Inżynierii Chemicznej Politechniki Poznańskiej. Doktorant wyznaczył kody łączników n oraz podstawników R w rozważanych strukturach, jako ich atrybuty warunkowe. Następnie, z eksperymentalnych wartości napięć powierzchniowych, wyliczył dla poszczególnych 266 związków wielkości ujemnego logarytmu krytycznego stężenia micelowania ($-\log\text{CMC}$), napięcia powierzchniowego w punkcie CMC (γCMC), nadmiaru powierzchniowego ($\Gamma \times 10^6$), powierzchni zajmowanej przez jedną cząsteczkę surfaktanta ($A \times 10^{-20}$) oraz swobodną energię adsorpcji danej cząsteczki ($-\Delta G_{\text{ads}}$).

Z kolei, z dużym nakładem pracy doświadczalnej pozyskane zostały dane biologiczne. Doktorant oznaczył MIC - minimalne stężenia chlorków bis-imidazoliowych, hamujące wzrost sześciu szczepów drobnoustrojów w przypadku *Staphylococcus aureus* (SAU), *Klebsiella pneumoniae* (KPN), *Pseudomonas aeruginosa* (PAE), *Escherichia coli* (ECO), *Enterococcus faecalis* (EFA) i *Candida albicans* (CAL). W tekście pracy jest notatka, że część oznaczeń MIC została wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum. Nasuwa się pytanie: jaka część i przez kogo?

Oznaczone wartości MIC zebrane zostały w Tabelach 4 i 5 dla obu podgrup chlorków bis-imidazoliowych. Muszę zauważyć, że Autor podał cyfry nieznaczące w zapisanych z dokładnością do sześciu miejsc po przecinku wartościach MIC, wyrażonych w mM/L.

Doktorant wyprowadził zależności między strukturą i parametrami właściwości powierzchniowych badanych surfaktantów, a ich miarami aktywności przeciwbakteryjnej stosując oprogramowanie jMAF, oparte o bibliotekę jRS (java Rough Set), opracowane w Zakładzie Inteligentnych Systemów Wspomagania Decyzji Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej.

Biorąc pod uwagę wartości MIC względem szczepu *Staphylococcus aureus* (SAU) mgr Łukasz Pałkowski wyróżnił trzy klasy aktywności badanych pochodnych: bardzo dobrą, średnią i

słabą. W Tabelach 6, 7 (i zbędnej Tabeli 8) związki z poszczególnych klas aktywności scharakteryzowane są strukturalnie (n, R) i przy użyciu pięciu wyliczonych z izoterm napięcia powierzchniowego parametrów fizykochemicznych. Niepotrzebnie, sumaryczna dla wszystkich 266 badanych związków Tabela 8 powtarza wartości zawarte w Tabelach 6 i 7 dla obu podgrup.

W kolejnej części pracy Doktorant przedstawił rankingi atrybutów warunkujących poprawność klasyfikacji poszczególnych związków do klasy 1 o najwyższej aktywności antydrobnoustrojowej i klasy 3 o najsłabszej aktywności. Posłużyły do tego współczynniki konfirmacji s siedmiu atrybutów warunkowych z Tabel 6 i 7. Przyznam, że współczynniki konfirmacji s na Rycinach 4-9 wydają mi się stosunkowo niskie: od -0,07 do 0,09, przy wartościach granicznych od -1 do 1. Nie mniej, wyprowadzone w oparciu o nie reguły decyzyjne mają dość wysokie miary konfirmacji (Tabele 9-11). Tego nie powiedziałbym raczej o regułach decyzyjnych dla klasy „nie 3” i „nie 1” połączonego zbioru badanych surfaktantów.

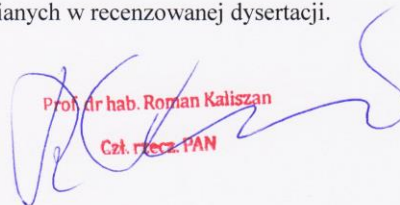
Reguły decyzyjne weryfikowano metodą krosvalidacji warstwowej (lepiej: „warstwowej walidacji krzyżowej”). Doktorant zastosował pięciokrotną walidację krzyżową przy podziale zbiorów związków na uczący i testowy. Niestety, najlepszą poprawność klasyfikacji (94,93 – 98,68%), a także jej dokładność i precyzję, uzyskano dla związków słabo aktywnych (klasa 3). Jednakże poprawność klasyfikacji związków klasy 1 (czyli najbardziej aktywnych przeciwdrobnoustrojowo) wynosi 78,92-83,46% i może być uznana za przydatną w praktyce projektowania leków.

Ważny jest sens fizyczny wyników analizy QSAR przeprowadzonej metodą DRSA. Uważam, że wykazanie przez Doktoranta zależności aktywności przeciwdrobnoustrojowej chlorków bis-imidazoliowych od długości podstawnika R przy pierścieniu imidazolu, ze wskazaniem optymalnej długości R od C7 do C13, jest znaczącym stwierdzeniem z punktu widzenia nowoczesnej chemii leków. Ciekawa jest także obserwacja, że właściwości biobójcze/biostatyczne surfaktantów korelują z wartościami krytycznego stężenia micelowania oraz nadmiaru powierzchniowego cząsteczki. Wydaje się, że celowa byłaby próba wyliczania tych parametrów w oparciu o modelowanie molekularne bez konieczności pomiarów izoterm napięcia powierzchniowego, a zatem bez konieczności syntezy „kandydatów na leki”

Można uznać, że cel pracy doktorskiej został zrealizowany a opracowany model, charakteryzujący się ogólną poprawnością na poziomie 80-90%, nie ustępuje odpowiednim modelom opisanym w literaturze fachowej. Nowatorskie z punktu widzenia chemii leków i tzw. „projektowania leków” jest zastosowanie oryginalnego podejścia obliczeniowego DRSA, opartego o teorię zbiorów przybliżonych Zdzisława Pawłaka.

Uważam, że oceniana praca doktorska jest bardzo wartościowa i spełnia ustawowe wymogi stawiane dysertacjom na stopień doktora nauk farmaceutycznych. Wnioskuje zatem do

Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr. Łukasza Pałkowskiego do publicznej obrony tez przedstawianych w recenzowanej dysertacji.


Prof. dr hab. Roman Kaliszan
Czł. rzesz. PAN