



dr hab. Lilianna Chęcińska, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej
Zakład Chemii Teoretycznej i Strukturalnej
ul. Pomorska 163/165 90-236 Łódź
e-mail: lilianna.checinska@chemia.uni.lodz.pl
tel.: +48 (42) 635 57 32

Łódź, dnia 5 maja 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wanat zatytułowanej „Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej i metod krystalografii kwantowej w badaniach kryształów związków o potencjale farmaceutycznym” (ang. *Applications of X-ray structural analysis and quantum crystallography methods in studies of crystals of substances with potential pharmaceutical importance*).

Praca doktorska została przygotowana na Międzywydziałowych Indywidualnych Studiach Matematyczno - Przyrodniczych oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem promotorów: prof. dr. hab. inż. Krzysztofa Woźniaka oraz prof. dr. hab. Rafała Sicińskiego. Doktorantka umiejętnie połączyła główne nurty prac badawczych w zespołach obu promotorów i w ten sposób swoje wszechstronne umiejętności posługiwania się zaawansowanymi metodami krystalografii kwantowej wykorzystwała w badaniach strukturalnych analogów witaminy D i ich prekursorów.

Tematyka badawcza doskonale wpisuje się w aktualne trendy badań interdyscyplinarnych, gdzie różnorodne, najnowsze techniki i metody badawcze wykorzystywane są w celu wyjaśnienia intrygujących zjawisk przyrodniczych. W przypadku niniejszej rozprawy szeroko pojęte badania strukturalne z wykorzystaniem promieniowania rentgenowskiego czy neutronowego pozwalają na zrozumienie szeregu aspektów związanych z aktywnością biologiczną układów witaminy D na poziomie atomowym a nawet elektronowym. Niewątpliwie zastosowanie coraz dokładniejszych modeli strukturalnych z wykorzystaniem możliwości, jakie daje krystalografia kwantowa, przyczyni się do rozwoju wielu nowatorskich koncepcji w badaniach nad substancjami o znaczeniu farmaceutycznym.

Struktura rozprawy

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest monotematycznym cyklem publikacji opatrzonym komentarzem Doktorantki. Cała rozprawa, podobnie jak materiały publikacyjne, na których jest oparta, została napisana w języku angielskim.

Układ pracy jest logiczny i odpowiada standardom dla doktoratów opartych na zbiorze publikacji. Dysertacja rozpoczyna się od podziękowań Doktorantki za współpracę w ramach projektów badawczych i wsparcie w trakcie powstawania doktoratu. Badania naukowe nie byłyby możliwe gdyby nie finansowanie z zewnętrznych źródeł. Doktorantka otrzymała grant Preludium oraz Etiuda a także uczestniczyła w grantie Maestro, którego beneficjentem był promotor prof. dr hab. Krzysztof Woźniak. Ważnym osiągnięciem było otrzymanie przez Panią Wanat stypendium dla wybitnych młodych naukowców sponsorowane przez Ministra

Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz uzyskanie kilku innych stypendiów finansowanych m.in. przez Uniwersytet Warszawski. Kolejna strona zawiera tytuł rozprawy w języku polskim oraz listę publikacji wchodzących w skład dysertacji, a także tych poza głównym nurtem badań. Następnie jest abstrakt w języku angielskim i nieco bardziej rozbudowane podsumowanie w języku polskim. Dopiero na stronie 17 został umieszczony spis treści, co jest jednak lekko kłopotliwe dla czytelnika z powodu trudności z odszukaniem dokładnie tej strony. Po spisie treści jest lista skrótów, a po niej zaczyna się właściwa numeracja kolejnych rozdziałów. Pierwszy rozdział to wstęp będący zarazem główną częścią właściwego autoreferatu. Na 19 stronach Doktorantka przedstawiła zarys najważniejszych zagadnień poruszanych w publikacjach, potrzebnych do zrozumienia tematyki pracy. Pani Wanat napisała ten rozdział w sposób zwięzły, a jednocześnie wyjątkowo przystępny oraz zrozumiały. Przegląd rozpoczyna się od omówienia roli krystalografii w badaniach farmaceutycznych oraz zdefiniowała szeroko pojętą krystalografię kwantową według najnowszych doniesień literaturowych. Bardzo podoba mi się opinia Doktorantki, że krystalografia kwantowa to krystalografia poza modelem atomów niezależnych (ang. *Independent Atom Model*, IAM), czego dowodzi Jej rozprawa doktorska. Pozostając w nurcie krystalografii kwantowej kolejne podrozdziały przybliżają podstawy wykorzystywanych w badaniach modeli tj. modelu multipolowego (ang. *Multipole Model*, MM), modelu deformacyjnej gęstości elektronowej zorientowanej na wiązania (ang. *Bond Oriented Deformation Density*, BODD), modelu atomów Hirshfelda (ang. *Hirshfeld Atom Refinement*, HAR), modelu przenaszalnych atomów asferycznych (ang. *Transferable Aspherical Atom Model*, TAAM) oraz modelu wynikającego z udokładnienia normalnych modów (ang. *Normal Mode Refinement*, NoMoRe). Ostatnie podrozdziały dotyczą zagadnień związanych z witaminą D. Drugi rozdział to cele pracy doktorskiej, wśród których za najważniejsze należy uznać określenie poprawności wyżej wymienionych modeli w odniesieniu do nisko- i wysokorozdzielczych danych dyfrakcyjnych (cel metodologiczny) oraz zastosowanie tych modeli w analizie strukturalnej analogów witaminy D (cel aplikacyjny). Zgodnie z zaproponowanym podziałem, na rozdział trzeci związany z celem metodologicznym składają się dwie publikacje stanowiące tzw. trzon rozprawy doktorskiej, a rozdział czwarty to kolejne trzy publikacje związane z celem aplikacyjnym. Moją opinię merytoryczną zamieszczam w dalszej części. Rozdziały piąty i szósty to odpowiednio wnioski oraz wykaz literatury obejmujący 101 pozycji cytowanych we wstępie rozprawy doktorskiej. W tym miejscu, na stronie 132 można uznać, że następuje swoisty koniec rozprawy doktorskiej ale jak się okazuje to zaledwie około 40% całej pozycji. Dalej w suplemencie A zostały zamieszczone oświadczenia współautorów, z których jednoznacznie wynika wiodący udział Pani mgr Wanat we wszystkich pięciu publikacjach. Co warto podkreślić, Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich tych artykułach. Najbardziej obszerny rozdział 8 (suplement B) (strony od 140 do 311) to materiały uzupełniające do publikacji wchodzących w skład dysertacji. Jak się zatem okazuje ogrom informacji w postaci tabel i rysunków ilustrujących wnikliwe porównanie badanych modeli strukturalnych znajduje się poza główną treścią publikacji. Niewątpliwie te materiały uzupełniające stanowią dowód ciężkiej i żmudnej pracy Doktorantki. Za zwięzłymi wnioskami dotyczącymi porównania wielu metod i modeli kryje się wnikliwa i dogłębna analiza wielu parametrów strukturalnych i wskaźników poprawności udokładnienia struktur. Ponadto w suplemencie prac nad analogami witaminy D dominują schematy oddziaływań międzycząsteczkowych oraz wizualizacja ram energetycznych w odniesieniu do najważniejszych składowych oddziaływań międzycząsteczkowych w badanych kryształach.

Ocena merytoryczna

W pierwszym artykule z kategorii badań metodologicznych opublikowanym w *Acta Crystallographica B* (2021), dla trzech substancji o znaczeniu farmaceutycznym, 1-oksa-4-azatrycyklo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-eno-3,5-dionu, ksylitolu oraz metylouracylu, Doktorantka zaproponowała następujące modele gęstości elektronowej: model deformacyjnej gęstości elektronowej zorientowanej na wiązania (BODD), model uzyskany z udokładnienia atomów Hirshfelda (HAR), model przenaszalnych atomów asferycznych (TAAM). Do udokładnienia tych modeli wykorzystwała niskorozdzielcze dane dyfrakcyjne ($d=0.8\text{\AA}$) zebrane przy użyciu promieniowania molibdenowego i miedziowego. Modelem odniesienia dla struktury każdej substancji był model uzyskany z udokładnienia danych neutronograficznych. Poprawność modeli została zweryfikowana poprzez szczegółowe porównanie kluczowych parametrów geometrycznych analizowanych cząsteczek (np. długości wiązań, miary kątów walencyjnych), objętości parametrów przesunięć atomowych oraz wartości końcowych parametrów udokładnienia (np. wartości resztkowych gęstości elektronowych czy wskaźników niezgodności).

W kolejnym artykule opublikowanym w *Molecules* (2021) Doktorantka zastosowała podobne kryteria do oceny poprawności modeli gęstości elektronowej tych samych trzech substancji, z tą różnicą, że zamiast modelu BODD udokładniła model multipolowy (MM), model HAR wzbogaciła także o zastosowanie udokładnienia normalnych modów (NoMoRe), a wszystkie udokładnienia przeprowadziła wykorzystując wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne.

Pozytywne wrażenie zrobiło na mnie zróżnicowanie modeli wynikające z zastosowania różnych sposobów traktowania atomów wodoru (izotropowo, anizotropowo, anizotropowo z wykorzystaniem opcji SHADE, ang. *Simple Hydrogen Anisotropic Displacement Estimator*; lub NoMoRe, itd.). Doceniam ogrom pracy jaki Doktorantka włożyła w bardzo szczegółowe i wyczerpujące opisy procedur tworzenia modeli, ich udokładnienia i analizy porównawczej w formie tabel i rysunków. Realizacja celu metodologicznego wymagała od Niej umiejętności interpretacji ogromnej liczby wyników. W efekcie Doktorantka przedstawiła wiele ciekawych wniosków płynących z tak przeprowadzonych badań. Za najważniejsze uważam potwierdzenie poprawności modeli udokładnianych z użyciem niskorozdzielczych danych dyfrakcyjnych oraz wyszczególnienie systematycznych błędów związanych z takim sposobem udokładnienia. Można śmiało stwierdzić, że metoda HAR wydaje się być najbardziej uniwersalną metodą uzyskiwania dokładnego modelu strukturalnego dla niskorozdzielczych danych.

Trzy artykuły z serii zastosowania metod krystalografii i krystalografii kwantowej w badaniach dotyczących analogów witaminy D (PRI-1730, PRI-1731, PRI-1732, BNR-1, SYN-1G) i ich produktów pośrednich (dwa diole i sulfon) ukazały się w *Crystal Growth and Design* (2018) i dwukrotnie w *Molecules* (2020, 2022). Pierwsze doniesienia bazują na zastosowaniu podstawowego modelu strukturalnego IAM w rozważaniach dotyczących konformacji układów pierścieniowych badanych cząsteczek oraz schematów upakowania cząsteczek w kryształach. Bardzo pomocne okazały się tutaj obliczenia energii par cząsteczkowych z zastosowaniem metod kwantowo-chemicznych oraz ich wizualizacja za pomocą ram energetycznych. W ten sposób Doktorantka wyjaśniła, że konformacja β pierścienia A jest preferowana ze względu na oddziaływania grup hydroksylowych, co z kolei determinuje niższą energię takiego ułożenia w porównaniu z konformacją α . Poza tym wykazała wpływ grupy metylenowej na schemat wiązań wodorowych w badanych

strukturach analogów witaminy D, a w konsekwencji na właściwości tych związków. Szczegółowa analiza wiązań wodorowych i ich energii z podziałem na składowe przyczyniła się potwierdzenia bezpośrednich relacji struktura-oddziaływania pomiędzy analogami witaminy D i ich prekursorami. Między innymi dzięki takim zależnościom możliwa była rekonstrukcja gęstości elektronowej analogów witaminy D (PRI-1730 oraz PRI-1731) za pomocą modelu przenaszalnych atomów asferycznych (TAAM) przy użyciu danych niskorozdzielczych. Dla kryształów analogów witaminy D lepiej rozpraszających promieniowanie rentgenowskie (BNR-1, Syn-1G) Doktorantka uzyskała wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne, na podstawie których udokładniła model multipolowy. Wgląd w strukturę elektronową kluczowych układów związanych z witaminą D daje zdecydowanie większe możliwości niż podstawowy model strukturalny IAM.

Podsumowując ocenę merytoryczną chciałabym podkreślić, że niektóre modele strukturalne zastosowane przez Panią Wanat w Jej badaniach są po prostu skomplikowane i w wielu przypadkach zapewne trudne do odtworzenia, chociaż czytając artykuły naukowe czy rozprawę doktorską mogą się wydawać proste. Dzieje się tak dlatego, że sukces w badaniach strukturalnych na poziomie krystalografii kwantowej wymaga przewyciężenia wielu kluczowych i krytycznych aspektów, począwszy od jakości próbek monokrystalicznych, przez eksperyment rentgenowski i doświadczenie w redukcji danych dyfrakcyjnych (tutaj w grę wchodzi także umiejętność radzenia sobie z danymi synchrotronowymi, neutronograficznymi, itd.), kończąc na konstruowaniu zaawansowanych modeli gęstości elektronowej badanych cząsteczek. W tym miejscu pragnę również zwrócić uwagę, że nadal w Strukturalnej Bazie Danych Cambridge (CSD) deponowane są struktury, dla których brak jednoznacznie określonych pozycji atomów wodoru, natomiast w pracach Doktorantki większość analizowanych modeli strukturalnych ma atomy wodoru udokładniane z anizotropowymi parametrami przesunięć, co na razie jest standardem dla atomów niewodorowych. Z kolei różnorodność zastosowanych metod doskonale uwypukla niezwykle umiejętności Doktorantki w posługiwaniu się najnowszym i specjalistycznym oprogramowaniem w dziedzinie szeroko pojętych badań strukturalnych wykorzystujących metody krystalografii kwantowej.

W tym kontekście podział doktoratu na dwie podstawowe części, metodologiczną i aplikacyjną, wydaje się doskonałym pomysłem, gdyż pozwoliło Doktorantce najpierw udoskonalić warsztat badacza, a potem wykazać jego użyteczność, tutaj konkretnie w badaniach nad związkami o potencjalnym znaczeniu farmaceutycznym.

Poniżej przedstawiam kilka komentarzy na temat zauważonych nieścisłości w rozprawie, które w żaden sposób nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej pracy.

- W wykazie skrótów pojawiło się niefortunne rozwinięcie skrótu CSD jako *Crystal Structure Database* zamiast *Cambridge Structural Database*. Prawdopodobnie błąd wynika ze skojarzenia bazy ze strukturami krystalicznymi, które tam są deponowane gdyż na stronie 14 w polskiej wersji streszczenia nazwa ta jest już przytoczona prawidłowo.
- Systematycznie w autoreferacie skrót QAIM jest rozwijany do *Atom In Molecules* zamiast *Atoms In Molecules*.
- Na stronie 29 wyrażenie pozwalające szacować energię wiązania wodorowego na podstawie gęstości energii potencjalnej zostało skrytykowane w literaturze fachowej jako mało dokładne i wiarygodne. Uważam, że odnośnik literaturowy M. Spackman, *How reliable are intermolecular interaction energies estimated from topological*

analysis of experimental electron densities? *Cryst. Growth. Des.* 2015, 15, 5624-5628, powinien być cytowany przez Doktorantkę w podrozdziale 1.2.3 by obiektywnie przedstawić omawianie zagadnienie.

- W rozdziale 6, gdzie zostały zebrane odnośniki literaturowe do prac cytowanych w autoreferacie, Doktorantka pominęła kilkanaście identyfikatorów publikacji w postaci adresu URL odsyłającego do wyszukiwarki DOI, które zdecydowała się zastosować jako informację uzupełniającą do podstawowych danych bibliograficznych. Ma to miejsce dla pozycji 11, 12, 28 i wielu innych.

Korzystając w przywileju bycia recenzentem chciałabym wywołać dyskusję publiczną z Doktorantką w oparciu o zagadnienia głównie eksperymentalne, które zwróciły moją uwagę w trakcie czytania rozprawy.

- Po pierwsze, analizując sposoby pozyskiwania danych dyfrakcyjnych do badań, zwróciłam uwagę, że wiele pomiarów zostało wykonanych przez Doktorantkę. Analizy porównawcze modeli strukturalnych obejmowały dane dyfrakcyjne zebrane z użyciem promieniowania miedziowego i molibdenowego dla różnych kryształów. W żadnym przypadku nie doszukałam się jednak porównania modeli dla tego samego kryształu. Pragnę zatem dopytać, z czego wynika brak analizy porównawczej mający na celu zbadanie odtwarzalności modeli z użyciem promieniowania $\text{CuK}\alpha$ i $\text{MoK}\alpha$?
- Po drugie pozostając przy kwestii eksperymentu rentgenowskiego, trzy substancje zaproponowane w analizie porównawczej różnych modeli strukturalnych, nie zawierały atomów ciężkich, innych niż C, N i O. Natomiast wśród analogów witaminy D i ich prekursorów można napotkać strukturę sulfonu, w której jest obecny atom siarki. Dla modeli strukturalnych tej substancji parametry końcowe udokładnienia są wyraźnie podwyższone w stosunku do pozostałych związków, co jest efektem spodziewanym chociażby ze względu na obecność atomu siarki. Chciałabym zapytać, jakie czynniki miały wpływ na wybór substancji testowych? Czy Doktorantka brała pod uwagę wpływ innych czynników jak np. obecność atomów ciężkich w strukturze na rozrzut wyników końcowych analizy porównawczej? Wiąże się z tym też wybór promieniowania rentgenowskiego, gdy współczynnik absorpcji μ jest wysoki.

Wniosek końcowy

Pani mgr Monika Wanat w swojej rozprawie doktorskiej pt. „Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej i metod krystalografii kwantowej w badaniach kryształów związków o potencjale farmaceutycznym” zaprezentowała nowe i oryginalne wyniki swoich badań naukowych. W mojej ocenie praca spełnia wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). Zatem wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Wanat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na wysoką wartość naukową recenzowanej przez mnie pracy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie. Stosowne pisemne uzasadnienie wniosku przedkładam w oddzielnym dokumencie zgodnie z zasadami wyróżniania prac doktorskich przyjętymi przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Warszawskiego.

L. Chęcińska



dr hab. Lilianna Chęcińska, prof. UŁ
Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej
Zakład Chemii Teoretycznej i Strukturalnej
ul. Pomorska 163/165 90-236 Łódź
e-mail: lilianna.checinska@chemia.uni.lodz.pl
tel.: +48 (42) 635 57 32

Łódź, dnia 5 maja 2022 r.

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE

rozprawy doktorskiej mgr Moniki Wanat zatytułowanej „Zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej i metod krystalografii kwantowej w badaniach kryształów związków o potencjale farmaceutycznym”.

Wniosek argumentuję bardzo wysokim poziomem merytorycznym rozprawy doktorskiej. Doktorantka wykazała się ogromną wiedzą z krystalografii kwantowej oraz umiejętnościami zastosowania różnorodnych modeli gęstości elektronowej w badaniach kryształów związków o potencjale farmaceutycznym, a także umiejętną interpretacją wyników analiz porównawczych.

Za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki uważam potwierdzenie poprawności modeli udokładnianych z użyciem niskorozdzielczych danych dyfrakcyjnych oraz wyszczególnienie systematycznych błędów związanych z takim sposobem udokładnienia. Niewątpliwie w literaturze fachowej brakowało usystematyzowanych badań w tym zakresie. Pani mgr Wanat dostarczyła wielu użytecznych schematów zastosowania zaawansowanych modeli strukturalnych, które mogą być wykorzystywane przez krystalografów na całym świecie. Ponadto, użycie przez Doktorantkę metod chemii kwantowej przyczyniło się do opisanie zmian konformacyjnych pierścienia A w strukturze analogów witaminy D, co było dotąd niewyjaśnionym zagadnieniem w literaturze.

L. Chęcińska