

Recenzja
rozprawy habilitacyjnej oraz opinia w sprawie nadania stopnia doktora
habilitowanego dr inż. Agnieszce Dybale- Defratyce

Dr inż. A. Dybała-Defratyca wychowała się w wiodącym w skali światowej ośrodku zajmującym się analizą kinetyki i mechanizmami reakcji. Wykorzystuje on przede wszystkim specjalistyczną technikę pomiaru efektów izotopowych i teoretyczne metody obliczeniowe dla wskazania barier energetycznych oraz struktury związków pośrednich. Prace habilitantki wpisują się w ten nurt badań kierowanych przez profesora Piotra Panetha.

Osiągnięcia naukowe. Habilitantka skupiła się na analizie dehalogenacji związków organicznych starając się, w oparciu o pomiary kinetycznych efektów izotopowych (KIEs), opisać przebieg reakcji chemicznych tej szczególnie uciążliwej dla środowiska naturalnego grupy związków. Badania prowadziła dwutorowo z jednej strony na modelowych prostych pochodnych alifatycznych, z drugiej na chloropochodnych fenoli. Wszystkie wyniki pomiarów KIEs były poddane głębokiej analizie w oparciu o metody kwantowo mechaniczne i modelowania molekularnego (QM/MM). Ich celem było wskazanie prawdopodobnej struktury stanu przejściowego (TS) i wyjaśnienie przebiegu reakcji.

Punktem wyjścia dla 9 prac ujętych w dorobku habilitacyjnym była wcześniej ogłoszona publikacja, w której autorka analizowała prostą reakcję S_N2 pomiędzy jonem cyjankowym a chlorkiem etylu. Stwierdziła wówczas, że żadna z 39 teoretycznych metod nie była w stanie poprawnie przewidzieć KIEs dla wszystkich eksperymentalnie znalezionych wartości. Starając się wyjaśnić przyczyny tych niepowodzeń szukała korelacji pomiędzy KIE a strukturą TS. Stwierdziła, że chociaż na ogół nie znaleziono liniowej zależności pomiędzy KIEs a rzędem wiązania $C_\alpha-Cl$ dla TS, to rząd wiązania w sposób liniowy zależał od procentu zmiany długości wiązania $C_\alpha-Cl$ dla większości badanych związków chemicznych. A efekt izotopowy dla Cl k^{35}/k^{37} (pominę tu odpowiednie równanie), dał się opisać iloczynem trzech członów, z których pierwszy uwzględniał wkład tunelowania w KIE (KIE_T), drugi był temperaturo-niezależny (TIF), trzeci zależny od temperatury (TDF). Wykazała, że iloczyn dwóch pierwszych był odpowiedzialny za brak liniowej korelacji pomiędzy Cl -KIE a strukturą TS. Natomiast liniową zależność znalazła dla członu TDF względem rzędu wiązania w TS, którą udokumentowała na przykładzie 25 różnych nukleofili w reakcji z chlorkiem metylu. Podanie metody w oparciu o którą stało się możliwym, na gruncie teoretycznym, przewidzieć uzyskane eksperymentalnie Cl -KIE uważam za duże osiągnięcie.

dr inż. A. Dybały-Defratyki. W kolejnych pracach chodziło o oszacowanie wpływu rozpuszczalników o wysokiej i niskiej polarności (DMSO i THF) na strukturę wymodelowanych TS. Wyznaczone wcześniej eksperymentalne wartości KIEs dla chloru, węgla, azotu i wodoru w roztworze o wysokiej polarności ($\epsilon = 49$) sugerowały, na podstawie jakościowych szacunków, że powstający TS powinien posiadać strukturę zbliżoną do produktu, tj. z krótkim wiązaniem NC-C α i długim C α -Cl. Natomiast teoretyczne metody analizujące przebieg reakcji w fazie gazowej ($\epsilon = 1$), a więc bez udziału rozpuszczalnika, sugerowały inną strukturę TS, gdzie wiązanie NC-C α powinno być długie a C α -Cl krótkie, zbliżone do struktury substratu a nie produktu. Zaslugą dr inż. A. Dybały-Defratyki było wyjaśnienie, na drodze eksperymentalnej, tej raczej frustrującej różnicy w interpretacji wyników. Ponieważ jednak reakcji nie mogła przeprowadzić w fazie gazowej, przeprowadziła ją w rozpuszczalniku o niskiej polarności ($\epsilon = 7.3$). Okazało się, że w roztworze THF większość KIEs nie wiele różniła się od wyznaczonych w DMSO. Wynik ten popierał wcześniej wypowiedzianą tezę iż w sytuacji, w której nukleofil i grupa odchodząca posiadają podobne ładunki nie będzie można zaobserwować wpływu rozpuszczalnika. Wskazał, że w tym przypadku w rozważaniach teoretycznych dopuszczalne jest zaniedbanie roli rozpuszczalnika dla przewidywania struktury TS.

Szczególnie cennym jest fragment badań habilitantki, w którym starała się rzucić światło na metabolizm halogenopochodnych w organizmach żywych. Dziedzina ta była zaniedbaną w enzymologii, która uwagę skupiała przede wszystkim na analizie reakcji ujętych ciągami i cyklami metabolicznymi, związanymi z dostarczaniem i magazynowaniem energii. Dr inż. A. Dybała-Defratyka zajęła się przemianami chlorowcopochodnych znajdujących w środowisku naturalnym. Ich źródłem są zanieczyszczenia wywołane działalnością człowieka lub procesami, które od lat zachodzą, a nie są związane z ludzką działalnością. Habilitantka w sposób zwięzły przedstawiła źródła tych zanieczyszczeń oraz organizmy biorące udział w transformacji halogenopochodnych. Jak wiadomo, szczególnie niebezpieczne są pochodne aromatyczne, które niezależnie od swych toksycznych właściwości, mogą interkalować z zasadami purynowymi lub pirymidynowymi kwasów nukleinowych i być przyczyną groźnych mutacji mogących prowadzić do powstawania nowotworów. Stąd tak ważnym był poznanie mechanizmów dehalogenacji chloropochodnych fenoli, którymi zajęła się dr inż. A. Dybała-Defratyka. Jedną z najciekawszych prac z tego zakresu była próba wyjaśnienia enzymatycznego mechanizmu reakcji usunięcia „atomu chloru” przez dwa białka otrzymane z różnych źródeł i pełniące różne funkcje w organizmach, a mianowicie peroksydazę

chrzanową (HRP) oraz tzw. dehaloperoksydazę (DHP). Struktury przestrzenne tych enzymów były znane, natomiast kinetyczne efekty izotopowe reakcji usunięcia chloru nie były badane jak i też szczegółowy mechanizm tych reakcji nie został poznany. Spośród trzech dróg usunięcia chloru: 1) hydrolitycznej, w której następuje zastąpienie halogenu przez grupę hydroksylową, 2) redukcyjnej - wymiany chloru na wodór oraz 3) utleniającej - utlenienia substratu z jednoczesnym usunięciem halogenu, ta ostatnia reakcja wydała się habilitantce najbardziej prawdopodobna oraz wspólna dla obu enzymów. Enzymy posiadały podobne motywy strukturalne, w tym pierścień porfirynowy z centralnie umieszczonym atomem żelaza oraz dwoma resztami imidazolowymi His po obu stronach cząsteczki hemu. Enzymy korzystały z cząsteczki wody utlenionej jako jednego ze substratów, a dość dobrze opisany mechanizm reakcji katalizowanej przez oksydazę chrzanową polegał na utlenianiu substratu. Powstawało jednak pytanie jaki jest szczegółowy przebieg reakcji katalizowanej przez te, różniące się między sobą, enzymy. Czy etap usunięcia chloru z jednego ze stanów (związków) przejściowych jest reakcją ograniczającą przebieg reakcji, co intuicyjnie wydawało się dość prawdopodobne, czy też tak nie jest. Odpowiedzi habilitantka poszukiwała na drodze eksperymentalnej, przez pomiar Cl-KIE a racjonalnej interpretacji wyniku dostarczyła w oparciu o głębokie rozważania teoretyczne i wiedzę o strukturze badanych białek. Okazało się, że w reakcjach prowadzonych przez te enzymy obserwuje się ten sam, a raczej taki sam brak Cl-KIE, co przynajmniej dla mnie, było zaskoczeniem. Stało się więc jasnym, że energia wiązania substratu i kolejne przekształcenia substratu wpłynęły na ukształtowanie takiego TS, w którym dalszy przebieg reakcji, usunięcia chloru, mógł zajść spontanicznie. Niezaprzeczalną zasługą dr inż. A. Dybały-Defratyki, w tym względzie było wskazanie, w oparciu o obliczenia QM/MM, że w toku reakcji enzymatycznej, katalizowanej przez te dwa enzymy (HRP i DHP), następują dwa kolejne jednoelektronowe reakcje utlenienia, generujące wolne rodniki, które prowadzą do powstania karbo-kationowej formy związku pośredniego odpowiadającego budową kompleksom Meisenheimera. Struktura ta ulega dehalogenacji przy nieznaczej barierze energetycznej.

W kolejnej pracy habilitantka zainteresowała się w jaki sposób bakterie i grzyby, stykając się w glebie z chloropochodnymi fenoli, mogą jeszcze inaczej przekształcać je do związków mniej toksycznych lub dających się dalej biodegradować. Chodziło o reakcje oligomeryzacji, których pierwszym etapem było powstawanie „dimerów” z chlorofenoli. Dziać się tak mogło, ponieważ w reakcji katalizowanej przez peroksydazy powstają wolne rodniki. Habilitantka rozważyła dla dwóch reakcji sprzęgania: rodnik-rodnik oraz rodnik-wyjściowa cząsteczka

cztery drogi przebiegu reakcji: rodnik-anion, rodnik-kation, rodnik-rodnik (stan singletowy) oraz rodnik-rodnik (stan trypletowy). Reakcje te przeanalizowała na przykładzie aż czterech różnych chloropochodnych fenoli. Wyszczególniłem te starania, ponieważ chciałem podać przykład z jaką skrupulatnością i pasją badawczą habilitantka podchodziła do tego ale i do innych problemów badawczych. W tym przypadku, jedna z pochodnych okazała się inhibitorem dla DHP co nie ułatwiło zadania, ale jednocześnie pozwoliło na wskazanie przypuszczalnego miejsca wiązania inhibitora, *notabene* poza centrum aktywnym. Najważniejszym jednak osiągnięciem analizy w/w reakcji było stwierdzenie, że w dwuetapowych reakcjach rodnik – kation i rodnik – rodnik może zachodzić wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie chloru (bez uwolnienia chloru) połączone ze znacznym KIE.

Omawiając osiągnięcia dr inż. Dybały-Defratyki nie sposób pominąć wkładu w ubogo reprezentowaną dziedzinę analizy bromo-kinetycznych efektów izotopowych (Br-KIE). Zaobserwowała, analizując tworzenie odczynnika Grignarda, znaczące różnice pomiędzy wartościami Br-KIEs obserwowanymi dla związków aromatycznych w odniesieniu do alifatycznych, co może nie jest zaskakujące, ale było potrzebnym uzupełnieniem wiedzy zarówno od strony eksperymentalnej jak teoretycznej.

Podsumowanie osiągnięć naukowych. Dr inż. Dybała-Defratyka ma oryginalny i poważny dorobek naukowy. Jest współautorką 3 prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora, 12 po uzyskaniu stopnia doktora, a nie wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, oraz 9 prac stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego. Łącznie posiada w dorobku 24 publikacje, w tym 19 objętych listą JCR. Indeks cytowań czasopism (IF), w których prace te opublikowano wynosi około 68 z czego IF ~62 przepada na okres po uzyskaniu stopnia doktora. Dorobek habilitantki był ponad 200-krotnie cytowany a index Hirscha wyniósł 9. Wyniki badań zostały zauważone i wyróżnione Nagrodą Zespołową Ministra Zdrowia, 2 nagrodami JM Rektora Politechniki oraz uzyskały wsparcie finansowe dla udziału w 2 prestiżowych konferencjach *Gordon'a* w USA.

Dorobek w zakresie kształcenia kadry naukowej. Dr inż. Dybała-Defratyka była promotorką pomocniczą obronionej pracy doktorskiej a także jest promotorką pomocniczą realizowanej obecnie pracy doktorskiej. Sprawowała opiekę nad jednym doktorantem i jedną osobą wykonującą pracę magisterską. Uważam, że dorobek ten aczkolwiek przeciętny, to spełnia wymagania stawiane kandydatom(-tkom) ubiegającym się o stopień dr habilitowanego.

Popularyzacja wiedzy, wykłady, recenzje. Habilitantka przedstawiała wyniki swoich badań na 18 Konferencjach naukowych, co z jednej strony można zaliczyć do dorobku naukowego a z drugiej jest formą popularyzacji wiedzy. Posiada wyróżniający się dorobek w zakresie dydaktyki w postaci 6 różnych wykładów semestralnych, z których 2 a mianowicie: *Metody Obliczeniowe w Projektowaniu Leków* oraz udział w przygotowaniu i prowadzeniu kursu z *Podstaw Modelowania Molekularnego* dla studentów Chemii i dla doktorantów wymagają szczególnego przygotowania i wysiłku. Brała udział w 3 warsztatach szkoleniowych. Była recenzentką kilkunastu manuskryptów zgłoszonych do redakcji czasopism z listy JCR.

Osiągnięcia organizacyjne i inne formy aktywności. Kandydatka do stopnia dr habilitowanego była pełnomocniczką Dziekana ds. ochrony praw autorskich, weszła w skład Zespołu Doradczego dla oceny działalności jednostek naukowych, przez 5 lat pełniła funkcję redaktora zarządzającego *Central European Journal of Chemistry, Versita* oraz przez rok jej dyrektorem wydawniczym. Brała udział w organizowaniu 2 międzynarodowych konferencji (sympozjum) na terenie Polski, jednej na terenie Francji. Obecnie jest z-cą dyrektora Międzynarodowego Instytutu Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej.

Współprace, staże. Habilitantka współpracowała z uczonymi z 4 ośrodków naukowych w USA, a także z uczonymi z Niemiec i Izraela. Odbyła też 2 roczne staże w Ameryce na uniwersytetach w Minesocie i Nebrasce oraz 2 krótkoterminowe pobyty we Francji i USA.

OPINIA. Dr inż. Dybała-Defratyka jest w pełni ukształtowanym pracownikiem nauki o szczególnie wysokich umiejętnościach w zakresie analizy mechanizmów reakcji. W tej dziedzinie jest światowej klasy specjalistką o rzadkim talencie łączenia zdolności eksperymentalnych z szeroką wiedzą w zakresie stosowania kwantowo mechanicznych metod obliczeniowych i modelowania molekularnego. Nie stroni, a wręcz pociąga ją analiza złożonych systemów jakimi są reakcje prowadzone w różnych warunkach, w tym z udziałem biokatalizatorów. Swojej dociekliwości, talentowi i wiedzy zawdzięcza trwałe wkłady jakimi wniosła w poznanie przemian jakim ulegają uciążliwe dla środowiska naturalnego chloropochodne związków organicznych. Posiada duże doświadczenie w zakresie dydaktyki. Sprawdziła się w pracach organizacyjnych na rzecz Uczelni, przy redagowaniu prac naukowych itp. Uważam, że jest wartościową osobą i w pełni spełnia warunki stawiane przed kandydatami(-tkami) do stopnia doktora habilitowanego.


Prof. zw. dr hab. Marian Kochman