



Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy
Zakład Chemii Fizycznej
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

dr hab. n. farm. Dariusz Maciej Pisklak

Tel.: (+48 22) 57 20 950

E-mail: dpisklak@wum.edu.pl

Warszawa, 01.12.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anety Baj p.t. „Synteza i badania strukturalne nowych analogów witaminy E”

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Wydziału Biologiczno - Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. UWB dr hab. Stanisława Witkowskiego. Rozprawa zatytułowana jest „Synteza i badania strukturalne nowych analogów witaminy E”, jednak moim zdaniem zakres badawczy pracy wykracza poza sformułowany temat. Doktorantka wykonała dodatkowo dla wybranych związków badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem testu DPPH oraz analizy kinetyki inhibicji autoksydacji styrenu oraz kumenu. Ponadto dla 1-karba- α -tokoferolu przeprowadzone zostały badania oddziaływania z modelowymi błonami z wykorzystaniem techniki DSC oraz spektroskopii UV.

Rozprawa Pani mgr Anety Baj napisana jest w sposób klasyczny z podziałem na „Wstęp literaturowy”, „Badania własne”, w której to części Doktorantka przedstawia tok prowadzonych badań i dyskutuje uzyskane wyniki, oraz „Cześć eksperymentalną” zawierającą precyzyjny opis przeprowadzonych syntez oraz charakterystykę spektroskopową poszczególnych uzyskanych w toku pracy związków. Moim zdaniem taki schemat pracy ułatwia czytelnikowi śledzenie toku badawczego prowadzonego przez Doktorantkę, a z drugiej strony stanowi łatwą w użytkowaniu bibliotekę danych spektroskopowych oraz przepisów syntetycznych. Warto przy tym nadmienić, że wszystkie trzy części są odpowiednio zrównoważone pod względem objętości tekstu. Praca napisana jest w sposób przejrzysty oraz poprawny językowo, liczne rysunki, schematy i tabele ułatwiają analizę toku badawczego oraz uzyskanych przez Doktorantkę wyników. W pracy zacytowanych jest 368 pozycji literaturowych, co

również świadczy o dobrym przygotowaniu Pani mgr Anety Baj do realizacji podjętego tematu badawczego.

Przedstawione w pracy badania własne składają się z dwóch części tworzących spójną całość. W pierwszym etapie Doktorantka zaprojektowała syntezę, otrzymała oraz dokonała charakterystyki spektroskopowej (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR) szeregu nowych wcześniej nieopisanych w literaturze analogów witaminy E. W grupie tej były pochodne tokoferolu i Troloksu, w których pierścień chromanu zastąpiony został układem tetraliny oraz nowe desmetylowe pochodne Troloksu i PMHC. Dodatkowo w ramach pracy otrzymała serię analogów α -tokoferolu modyfikowanych w pozycji C-2, które posłużyły jako związki modelowe w badaniach strukturalnych oraz antyoksydacyjnych przeprowadzonych w kolejnych rozdziałach pracy. Warto podkreślić, że samodzielna synteza wykorzystanych w pracy związków modelowych wpłynęła korzystnie nie tylko na kosztorys prowadzonych badań, ale również zwiększyła doświadczenie Pani mgr Anety Baj jako chemika syntetyka i z pewnością jeszcze lepiej przygotowało do prowadzenia dalszych projektów naukowych w tej dziedzinie.

W drugiej części pracy zatytułowanej „Badania strukturalne” Doktorantka przeprowadziła analizę dynamiki molekularnej wybranych karbaanalogów tokoferolu oraz układów modelowych zawierających pierścienie chromanolu. W badaniach wykorzystano techniki spektroskopii ^1H oraz ^{13}C NMR w roztworze połączone z analizą temperaturową zależności kształtu linii w widmie NMR. Celem badań było określenie wpływu atomu tlenu w pierścieniu chromanu oraz charakteru podstawnika przy węglu C2 na dynamikę oraz preferencje konformacyjne w grupie pochodnych tokoferolu. W pierwszym etapie przedmiotem analizy były modelowe pochodne chromanolu. W badaniach przeprowadzonych dla pochodnych acetylowych wykazano, że bariera inwersji pierścienia zależy od charakteru podstawnika przy węglu C2, a o wiarygodności otrzymanych wyników świadczy to, że wyznaczone parametry ΔG są zbliżone do literaturowych danych wyznaczonych dla inwersji pierścienia w acetylowej pochodnej PHMC. Ważnym aspektem było również oszacowanie preferencji konformacyjnych. Do oceny ilościowej populacji konformerów wykorzystano widma ^{13}C NMR z odwrotnym bramkowaniem, a jako uzupełnienie tej analizy zastosowano metody obliczeniowe DFT. Doktorantka wykazała, że obecność grupy karbonylowej w miejscu podstawienia węgla C2 prowadzi do preferencji konformacji aksjalnej tego podstawnika. Wyniki znalazły potwierdzenie w analizie rentgenostrukturalnej wykonanej dla Troloksu. Analogiczne badania Doktorantka przeprowadziła dla nieopisanych wcześniej w literaturze, zsyntetyzowanych w ramach pracy pochodnych karbaanalogów oraz desmetylowych pochodnych Troloksu. W badaniach wykazano, że dla związków zawierających pierścienie tetraliny preferencja konformacyjna jest podobna jak w przypadku pochodnych chromanolu, z przewagą konformacji z aksjalnym położeniem podstawnika. Postulowana przez Doktorantkę rola grupy metylowej jako zawady sterycznej została potwierdzona w badaniach przeprowadzonych dla pochodnych desmetylowych. W związkach tych następowała zmiana preferencji konformacyjnej na położenie ekwatorialne. Na podstawie pomiarów temperaturowych NMR Doktorantka wykazała, że wprowadzenie grupy metylenowej w miejsce atomu tlenu w pierścieniu chromanu obniża barierę potencjału przejścia konformacyjnego oraz zwiększa dynamikę układu.

Dla wybranych związków zostały wykonane również badania aktywności antyoksydacyjnej, w których wykazano, że pochodne zawierające w strukturze pierścień tetraliny mają niższą aktywność antyoksydacyjną w porównaniu do pochodnych chromanolu, co potwierdziło hipotezę dotyczącą kluczowej roli heterocyklicznego atomu tlenu w aktywności antyoksydacyjnej witaminy E.

W mojej ocenie temat podjęty w dysertacji jest istotny z punktu widzenia nie tylko poszukiwania nowych związków o aktywności antyoksydacyjnej, ale również ma wpływ na lepsze zrozumienie na poziomie molekularnym mechanizmu aktywności biologicznej związków z grupy witamin E. Wydaje się również, że uzyskane w doktoracie związki warto przebadać pod względem aktywności farmakologicznej. Pochodne tokoferoli o obniżonym potencjale antyoksydacyjnym są postulowane jako ligandy mitochondrialnego kompleksu II o aktywności proapoptotycznej, dlatego dla zsyntetyzowanych w pracy związków warto przeprowadzić badania w kierunku aktywności przeciwnowotworowej.

Po zapoznaniu się z treścią dysertacji mam kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy.

- Dlaczego do oszacowania populacji oraz bariery inwersji dla pochodnych chromanolu wykorzystano tylko sygnał węgla C2? Dla części związków można było wykonać również analizę innych sygnałów. Dla związku 142 w widmach ^{13}C NMR (rys 42) widoczne jest podwojenie sygnałów również innych atomów węgla np.: C3, C8. W przypadku karbaanalogów taką analizę wykonano dla kilku sygnałów w widmie, a zbliżone wyniki świadczą o wiarygodności uzyskanych parametrów.

- W opisie i dyskusji struktur rentgenograficznych niejasne jest czy wyniki analizy rentgenostrukturalnej są wynikami uzyskanymi w ramach pracy doktorskiej. Jeśli tak jest, to brak jest ich opisu w części eksperymentalnej.

- W pracy Doktorantka wspomina, że w strukturze XRD R/S Troloxu "zawartość komórki elementarnej stanowi jedna molekula" (str. 104). W rzeczywistości występują dwie molekuly w komórce elementarnej $Z=2$, ale ze względu na występującą symetrię układu w części asymetrycznej komórki elementarnej jest tylko jedna cząsteczka $Z'=1$ (CCDC 1483208).

- W pracy nie wspomniano w jaki sposób była wyznaczana populacja konformerów otrzymana na podstawie obliczeń DFT (najprawdopodobniej na podstawie statystyki Boltzmana, ale nie jest to sprecyzowane w pracy).

Doktorantka w trakcie redagowania pracy nie ustrzegła się również drobnych niedociągnięć językowych i edytorskich:

- w schemacie na rysunku 50 zamiast " $\text{R}' = \text{COOCH}_3$ " i " $\text{R}' = \text{COOH}$ " powinno być $\text{R}' = \text{CH}_3$ i $\text{R}' = \text{H}$;
- schemat nr 17, odwrócenie kierunku strzałek od substratu do produktu zwiększyłoby jego przejrzystość;
- na rysunku 38 brak jest pochodnej 165, która wspomniana jest w tekście, w opisie części syntetycznej związek 165 to produkt pośredni w syntezie związku 166;
- str. 70 sformułowanie „wygenerowaną pochodną” jest moim zdaniem niefortunne, do generowania służy generator a Doktorantka własnoręcznie zsyntetyzowała tę pochodną;

- pojawiające się w pracy sformułowania „ostry sygnał” jest kolokwializmem i powinno być raczej zamienione na wąski sygnał. To samo dotyczy sformułowania „pik”, w spektroskopii NMR używa się pojęć „sygnał” lub „linia rezonansowa”. Również pojęcie „rozmycie sygnału” powinno być zastąpione na „poszerzenie sygnału”;
- str. 114 sformułowanie „oddziaływania anizotropowe” jest moim zdaniem nieprawidłowe (oddziaływania mogą być dipolowe, Zeemanowskie (taka jest ich natura fizyczna) powinno to być sformułowane jako anizotropia oddziaływania;
- str. 120 wydaje się, że lepszym sformulowaniem zamiast „parametrem opisującym związek” jest określenie „parametrem opisującym aktywność antyoksydacyjną związku”;
- tabele 11 i 17, wyniki w tych tabelach powinny być prawidłowo zaokrąglone;
- str. 64 podwojenie sygnału w widmie NMR nie świadczy o polimorfizmie, a może wskazywać na występowanie dwóch cząsteczek w asymetrycznej części komórki elementarnej (polimorfizm związany jest z występowaniem związku w kilku odmianach krystalicznych).

Te drobne uwagi nie wpływają jednak na wysoki poziom niniejszej dysertacji.

W mojej ocenie dysertacja Pani mgr Anety Baj świadczy o tym, że Doktorantka jest osobą w pełni przygotowaną do prowadzenia badań naukowych, temat badawczy podjęty w pracy jest istotny z naukowego punktu widzenia, zaś uzyskane w doktoracie wyniki poszerzają wiedzę związaną z chemią pochodnych tokoferoli. Chciałby również podkreślić, że Doktorantka jest współautorem 10 publikacji o zasięgu międzynarodowym, przy czym w trzech publikacjach jest pierwszym autorem co na tym etapie pracy naukowej jest dużym osiągnięciem.

Na podstawie przedstawionej do oceny pracy stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anety Baj pt. "Synteza i badania strukturalne nowych analogów witaminy E" wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Stanisława Witkowskiego, prof. UwB oraz promotora pomocniczego Pana dr Piotra Wałęjki spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z przepisami ustawy z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65 poz. 595z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej pracy doktorskiej, istotną z punktu naukowego tematykę rozprawy, oraz to, że część wyników została opublikowana w czasopiśmie zasięgu międzynarodowym wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.

Pisklak Dariusz Maciej

Pisklak Dariusz Maciej