



Białystok 24.08.2017

### Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Joanny Urbaniak  
pt. „Resveratrol esters: synthesis, structure and biological activity”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Alicji Joanny Urbaniak pt. „Resveratrol esters: synthesis, structure and biological activity” (Estry resweratrolu: synteza, struktura i aktywność biologiczna) została wykonana w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierownictwem dr hab. Karola Kacprzaka, prof. UAM.

Podstawą rozprawy doktorskiej są dwie oryginalne prace, stanowiące spójny zbiór tematyczny, opublikowane w czasopismach będących na liście JCR: *Synthesis* (IF = 2,652) i *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (IF = 2,486). Obie prace mają charakter opracowań wieloautorskich, w których mgr Urbaniak jest pierwszym autorem i zgodnie z załączonymi oświadczeniami pozostałych autorów wydaje się mieć dominujący wkład w ich powstanie.

Oceniana dysertacja jest napisana w języku angielskim i ma formę zwięzłego autoreferatu omawiającego uzyskane wyniki. Badania własne, omówione w trzech krótkich rozdziałach, poprzedzone są wstępem i opisem celu pracy. Ponadto rozprawa zawiera życiorys Doktorantki, wykaz jej dorobku naukowego, streszczenie w języku angielskim i polskim, podsumowanie osiągnięć oraz kopie opublikowanych prac naukowych wraz informacjami uzupełniającymi (Supplementary Material) i oświadczeniami współautorów.

We wprowadzeniu Autorka zapoznaje czytelnika z budową i właściwościami biologicznymi *trans*-resweratrolu oraz omawia dane SAR dla wybranych analogów tego związku, skupiając się przede wszystkim na hydroksylowych i metoksyłowych pochodnych. Na koniec tej części Doktorantka przedstawia krótkie uzasadnienie wyboru tematyki badawczej.

W mojej ocenie tego fragmentu pracy, dużo większy nacisk powinien być położony na estrowe pochodne resweratrolu, szczególnie że tytuł tego rozdziału brzmi „Resveratrol esters – overview”. Faktycznie, zgodnie ze słowami Doktorantki, nie ma dużo doniesień literaturowych dotyczących syntezy i aktywności tego typu pochodnych, natomiast te, które się ukazały nie zostały w pełni omówione. Pomimo niewielkiego rozmiaru tego rozdziału (trzy strony) można znaleźć w nim liczne nieścisłości, pomyłki edytorskie, błędy gramatyczne i interpunkcyjne. Z obowiązku recenzenta wymienię te najistotniejsze:

- str. 15: „Although studies suggested that the 4-hydroxy group in the *trans* conformation on 4- and 4'-position of stilbene backbone was crucial for antiproliferative effect of RV....” – niepoprawne sformułowanie, zapewne chodzi tu o obecność grupy OH w pozycji 4 lub 4' oraz konfigurację *trans* wiązania podwójnego w cząsteczce RV,
- str. 15: 3,5-hydroxypterostilbene – błąd w nazwie. Wydaje się, że powinno być 3,5-dihydroxypterostilbene, co jest inną nazwą resweratrolu, więc najprawdopodobniej chodzi o monohydroksylową pochodną pterostilbenu, ale nie jest jasne o jaką,
- str. 15 i 16: display zamiast displays, shown zamiast showed,
- str. 17: „Specific studies focused on the evaluation of *t*RV methyl ethers with different number of methoxy and hydroxyl groups replaced by methoxy groups revealed that 2-methoxy-4'-thiomethyl-*trans*-stilbene and 3-methoxy-4'-thiomethyl-*trans*-stilbene were the most potent selective inhibitors of CYP family 1 enzymes which...” – sformułowanie jest niejasne i pomija wpływ obecności grupy metylosulfanylowej,
- str. 17: „Thus conjugates of *t*RV with triphenylphosphonium yielded 4-triphenylphosphoniumbutyl-4'-O-resveratrol iodide and its bis acetylated derivative were found to accumulate into energized mitochondria and exerted cytotoxic effect on fast-growing cell..” – zdanie napisane niepoprawnie gramatycznie i merytorycznie.

Przed częścią zawierającą opis badań własnych Doktorantka jasno i zwięźle przedstawia cel pracy. Założeniem niniejszej dysertacji było opracowanie prostej i wydajnej metody syntezy triestrów resweratrolu, a następnie otrzymanie serii triacylowanych pochodnych tego polifenolu i zbadanie ich aktywności cytotoksycznej na komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej pobranych od pacjentów. W literaturze naukowej obserwuje się spore zainteresowanie resweratrolem i jego analogami. Ten naturalny stilbenoid, występujący między innymi w owocach jagodowych, winogronach, orzeszkach ziemnych, wykazuje szerokie spektrum aktywności biologicznej. Przeprowadzone badania udowodniły jego właściwości kardioprotekcyjne, chemoprewencyjne, neuroprotekcyjne, hepatoprotekcyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe. Jednak wykorzystanie resweratrolu w praktyce jest ograniczone poprzez jego niską biodostępność i szybki rozkład do mniej aktywnych metabolitów. W związku z tym poszukiwanie analogów tego związku o lepszej biodostępności, a także silniejszym lub bardziej selektywnym działaniu biologicznym jest aktualne i potrzebne. Na tym tle tematyka rozprawy wydaje się jak najbardziej uzasadniona i ciekawa, a wyniki przeprowadzonych badań mogą prowadzić do pogłębienia dotychczasowej wiedzy i uzupełniania danych dotyczących zależności aktywności od struktury (SAR) dla tego związku.

Badania mgr Urbaniak zostały zaprezentowane w formie dwóch artykułów. W pierwszej pracy opublikowanej w *Synthesis* w 2016 roku Doktorantka opracowała wydajną metodę syntezy triestrów z resweratrolu i odpowiedniego chlorku kwasowego w obecności DBU i DMAP z wykorzystaniem ogrzewania mikrofalowego. Użycie mikrofal pozwoliło znacząco skrócić czas reakcji oraz w większości przypadków

podnieść wydajność w porównaniu do syntezy z zastosowaniem tradycyjnego ogrzewania. Opracowana procedura została wykorzystana do syntezy serii resweratrolowych estrów różnych kwasów aromatycznych i alifatycznych, w tym cynamonowego i 3,4-dimetoksycynamonowego.

W drugiej publikacji w *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* zaprezentowane zostały wyniki badań aktywności cytotoksycznej otrzymanych estrowych pochodnych resweratrolu w stosunku do komórek ostrej białaczki limfoblastycznej. Na potrzeby tej pracy, w celu powiększenia biblioteki analogów, Doktorantka otrzymała 6 dodatkowych triestrów resweratrolu: triizowalerian, tris(chloroactan) oraz cztery pochodne kwasów hydroksycynamonowych (*o*- i *p*-kumarowego, ferulowego i synapinowego - niestety charakterystyka tych estrów nie została zamieszczona w publikacji, pomimo, że nie były one wcześniej opisane) oraz jedną pochodną eterową - 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystilben. Trzy z przebadanych pochodnych estrowych, trioctan, triizobutanian i triizopentanian resweratrylu, okazały się bardziej aktywne niż resweratrol.

Rozprawa zawiera także rozdział pt. „Resveratrol – hydroxycinnamic acid conjugates”, w którym zaprezentowane zostały jeszcze nieopublikowane rezultaty badań dotyczących syntezy i aktywności antyoksydacyjnej resweratrolowych estrów kwasów *o*- i *p*-kumarowego, ferulowego i synapinowego. Niestety, zgodnie z ustawą nie mogę do tego materiału odnieść się w recenzji.

Przedstawione w obu pracach wyniki badań merytorycznie nie budzą wątpliwości. Podlegały one również szczegółowej ocenie przez recenzentów i wydawców renomowanych wydawnictw. Pomimo tego w rozprawie znalazły się nieścisłości i błędy, które z obowiązku recenzenta muszę wymienić:

- str. 21, schemat 1: niewłaściwy wzór produktu,
- str. 22 oraz w publikacji *Synthesis* **2016**, *48*, 1002-1010: bardziej poprawnie (zgodnie z „Nomenklaturą Związków Organicznych, Rekomendacje IUPAC i Nazwy Preferowane 2013”, P16-3) było by nazwać triestry: resweratryl tris(2,6-dichlorobenzoate), tris(4-nitrobenzoate), tris(2,3-dimethoxybenzoate), tris(3,4,5-trimethoxybenzoate), tris(3,4-dimethoxycinnamate) niż resweratryl tri-2,6-dichlorobenzoate, tri-4-nitrobenzoate, tri-2,3-dimethoxybenzoate, tri-3,4,5-trimethoxybenzoate, tri-3,4-dimethoxycinnamate,
- str. 23, Tabela 1: moim zdaniem śledzenie porównania testowanych metod estryfikacji resweratrolu ułatwiło by dodanie w tabeli danych dla reakcji wykonywanych pod ciśnieniem oraz czasu trwania reakcji,
- str. 31 w tekście oraz w podpisie schematu 3: błędna nazwa otrzymanej eterowej pochodnej – 3,3',4,4',5,5'-hexahydroxystilbene,
- str. 31 oraz w publikacji *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 2766-2770: błędna nazwa resweratryl trichloroacetate powinno być resweratryl tris(chloroacetate),
- str. 31: przy opisie otrzymywania 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystilbenu, powinien zostać podany odnośnik literaturowy w związku z tym, że synteza ta została już wcześniej opublikowana,

- str. 32, Tabela 5, wiersz pierwszy, kolumna pierwsza: jak wynika z tekstu chodzi o resweratrol a nie trimrówczan resweratrylu (błędny zapis R = H),
- str. 32, Tabela 5: nie znalazłam w tej tabeli ani w załączonej publikacji wartości IC<sub>50</sub> dla 3,3',4,4',5,5'-heksametoksystilbenu, który miał być wzorcem. Nasuwa mi się też pytanie dlaczego właśnie taka pochodna eterowa została wybrana jako związek porównawczy,
- str. 33: „Higher biological activity of small-sized aliphatic tRV esters might be related to their better bioavaibility because the substitution of hydroxy with alkoxy groups increases their lipophilicity.” – powinno być acyloxy groups,
- str. 35, 37, 43, 45: niezgodna ilość otrzymanych nieopisanych triestrów resweratrylu (raz podana jest ilość 12, a raz 15. Według mnie, Doktorantka otrzymała 16 pochodnych estrowych, w tym 14 nowych),
- str. 43, 45: mimo, że nie znalazłam takiego zapisu w ustawie, uważam, że treść streszczenia w języku polskim i angielskim powinna być tożsama.

Pomimo przedstawionych powyżej uwag uważam, że wszystkie założone cele badawcze zostały zrealizowane i przedstawiony materiał eksperymentalny stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch pracach, w których Doktorantka pełniła rolę wiodącą. Były one także zaprezentowane na czterech konferencjach międzynarodowych i dwóch krajowych. Warto podkreślić, że Doktorantka otrzymała grant z Fundacji Kościuszkowskiej na przeprowadzenie badań biologicznych na Uniwersytecie w Arkansas (USA). Na uznanie zasługuje też interdyscyplinarny charakter wykonywanych prac niezbędny do zrealizowania postawionych celów badawczych.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Alicji Joanny Urbaniak spełnia wymogi art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Alicji Joanny Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Wojtkaiewicz