



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Elżbieta Wojaczyńska
Wydział Chemiczny
Politechniki Wroclawskiej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław
tel. 71 320 2410
e-mail: elzbieta.wojaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 21 sierpnia 2017 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alicji Joanny Urbaniak
zatytułowanej „Resveratrol esters: synthesis, structure and biological activity”,
wykonanej w na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Alicji Urbaniak wykonana została na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr. hab. Karola Kacprzaka, profesora UAM. Istotną część badań doktorantka przeprowadziła podczas stażu w University of Arkansas for Medical Sciences w Little Rock (Stany Zjednoczone). Tematyka rozprawy dotyczy syntezy, struktury i aktywności biologicznej estrów (*E*)-resweratrolu, trihydroksylowej pochodnej stilbenu znanej z działania przeciwtleniającego, przeciwgrzybiczego, przeciwzapalnego i antyproliferacyjnego. Niektórzy badacze wiążą z nim znaczne nadzieje na skuteczną walkę z objawami starzenia. Ograniczenia w możliwym szerszym zastosowaniu terapeutycznym resweratrolu wynikają z jego łatwości przekształcenia w komórkach, wynikającej z reaktywności grup hydroksylowych, aktywowanych pierścieni aromatycznych czy wiązania podwójnego. Obserwuje się na przykład odwracalne transformacje w siarczany i glukoronidy, tworzenie form dimerycznych (restrytisoles, winiferyna) bądź nieaktywnych izomerów *Z*. Nie ustają zatem poszukiwania formy, w jakiej związek ten mógłby być dostarczony w sposób skuteczny w docelowe miejsce, zachowując przy tym pożądaną aktywność. Zaskakujący jest fakt, że do tej pory mało uwagi poświęcono możliwości wykorzystania w tym celu estrów kwasów karboksylowych. Badania pani mgr Alicji Urbaniak wypełniają tę lukę.

Praca ma formę cyklu złożonego z dwóch artykułów naukowych w języku angielskim, opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym o współczynnikach wpływu 2,65

(*Synthesis*) i 2,45 (*Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*; wartości IF z 2016 roku). Prace poprzedzone są wykazem osiągnięć Doktorantki oraz omówieniem napisanym również w języku angielskim. W obu pracach pani mgr Alicja Urbaniak jest pierwszą autorką. Załączone oświadczenia współautorów publikacji wskazują na jej dominujący wkład w prace eksperymentalne oraz istotny udział w kreowaniu koncepcji badań. Trudno oczywiście oczekiwać, by na tym etapie rozwoju naukowego doktorant samodzielnie określał kierunek czy ogólną ideę pracy, niezbędne jest wsparcie ze strony promotora. W przypadku pracy nr 1 nie ma najmniejszej wątpliwości, że pani Urbaniak przeprowadziła wszystkie syntezy i oczyszczania estrów resweratrolu oraz ich charakterystykę fizykochemiczną i zestawiła uzyskane wyniki. Otrzymała również kryształy dwóch związków. Rolą współauterek pracy, prof. dr hab. Urszuli Rychlewskiej i dr Beaty Warzajtis, było wykonanie pomiarów dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego, rozwiązanie struktur oraz opracowanie danych krystalograficznych. Warto wspomnieć jeszcze o pomocy technicznej w prowadzeniu eksperymentów z zastosowaniem mikrofal dwóch osób, których nazwiska można znaleźć w podziękowaniach (mgr Paweł Czarnecki i dr Michał Gładysz). W publikacji nr 2, oprócz pracy syntetycznej, mgr Alicja Urbaniak uczestniczyła też w badaniach aktywności biologicznej otrzymanych połączeń prowadzonych *in vitro*, pod naukowym nadzorem prof. Timothy'ego Chambersa i przy współudziale doktorantki Magdaleny Delgado z Univerity of Arkansas for Medical Sciences. Oświadczenia wskazują, że pani Urbaniak nie ograniczyła się jedynie – jak to z reguły ma miejsce w badaniach prowadzonych we współpracy naukowej chemików i biochemików czy biologów molekularnych – do dostarczenia oczyszczonych związków chemicznych do badań biomedycznych, ale brała w nich aktywny udział, co umożliwiło jej otrzymane stypendium wyjazdowe Fundacji Kościuszkowskiej. Podsumowując, dominujący wkład Doktorantki w powstanie obu publikacji składających się na przedstawiony cykl sprawia, że może on stanowić podstawę jej dysertacji.

Weryfikacja hipotezy, że przekształcenie *E*-resweratrolu w pochodne estrowe może mieć istotny wpływ na aktywność biologiczną otrzymanych połączeń, wymagała w pierwszym etapie systematycznych prac nad syntezą odpowiednich związków. Badania opisane w pracy nr 1 doprowadziły do optymalizacji procedury, pozwalającej w sposób wydajny (9 z 10 związków otrzymano z wydajnością 72-94%) i selektywny uzyskać triestry z resweratrolu i odpowiednich chlorków kwasowych, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych, z dodatkiem DBU i DMAP w acetonitrylu. Cenną modyfikacją, pozwalającą znacznie skrócić czas reakcji, a w niektórych przypadkach prowadzącą również do zwiększenia wydajności chemicznej procesu było wykorzystanie reaktora mikrofalowego. Uzyskane produkty oczyszczane były chromatograficznie, jednak w niektórych przypadkach możliwe okazało się oczyszczanie na drodze krystalizacji w układzie octan etylu – *n*-heksan. Dwa spośród triestrów, jeden z podstawnikami alifatycznymi, a

drugi – aromatycznymi, zostały poddane analizie rentgenograficznej, wskazującą na różnice konformacyjne rdzenia stilbenowego i różne ułożenie podstawników acylowych względem jego płaszczyzny (warto zauważyć, że różna była też temperatura pomiaru, co sprawia, że do wszelkich porównań należy podchodzić ostrożnie). Dla otrzymanych pochodnych obliczone zostały parametry będące miarą hydrofobowości i zdolności do penetracji błony komórkowej.

Metodologia opisana w pracy 1 została wykorzystana do syntezy innych triestrow; 15 takich pochodnych oraz heksametoksystilben jako związek porównawczy posłużyło do badań aktywności antyproliferacyjnej prowadzonych na komórkach ostrej białaczki limfoblastycznej. Dwa związki wykazały cytotoksyczność zbliżoną do niezmodyfikowanego resweratrolu, natomiast trzy – krótkołańcuchowe estry alifatyczne – 2-3-krotnie większą. Dalsze badania pozwoliły po części wniknąć w mechanizm ich działania, polegający na indukcji ekspresji białka p53, wywołującego proces apoptozy komórek.

Z przedstawionych prac wynika, że mgr Alicja Urbaniak otrzymała i scharakteryzowała 12 triestrowych pochodnych *E*-resweratrolu (w większości syntezowała je wg trzech różnych procedur; dodatkowo trzy estry kwasu hydroksycynamonowego znalazły się w materiale jeszcze nie opublikowanym) oraz jego pochodną heksametoksyłową. Przeprowadzone syntezy wskazują na bardzo dobre opanowanie procedur eksperymentalnych stosowanych w chemii organicznej, obejmujących prowadzenie reakcji w różnych warunkach i oczyszczanie związków na drodze chromatografii i krystalizacji, a także technik analitycznych używanych do charakterystyki wyodrębnionych produktów (w szczególności spektroskopii NMR). Na podkreślenie zasługuje wspomniany już czynny udział Doktorantki w testach biologicznych.

W publikacjach, który przeszły kilkietapowy proces recenzji i korekty trudno oczywiście doszukiwać się poważniejszych uchybień (w pracy 2 zauważyłam zwrot „conversation of MTT to blue MTT-formazan crystals” zamiast „conversion”). Zastanowił mnie jednak brak badania selektywności działania aktywnych związków w pracy nr 2 – czy wykazują również toksyczność w stosunku do normalnych komórek? Przydałyby się – najwyraźniej niewymagane przez czasopisma – teoretyczne wartości masy cząsteczkowej obok odczytanych z widm MS. W materiałach uzupełniających do publikacji 2 w przypadku związku **16** nie zostały podane wyniki analizy elementarnej, a dla związku **4** różnice w wartościach wyznaczonych i obliczonych są bardzo duże.

Do publikacji wraz z obszernymi materiałami uzupełniającymi (m.in. pełna charakterystyka fizykochemiczna związków oraz kopie widm NMR) dołączony jest komentarz Autorki, obejmujący wprowadzenie, sformułowanie celu rozprawy, skrócony opis przeprowadzonych badań i podsumowanie. Pisząc wstęp mgr Alicja Urbaniak nie ograniczyła się do mechanicznego połączenia początkowych akapitów dwóch publikacji, jest on bowiem nie tylko ich syntezą, ale i rozszerzeniem; świadczy o tym chociażby przywołanie blisko 30 artykułów niecytowanych w obu

pracach. Moje wątpliwości wzbudziło sformułowanie ze strony 15 „...4-hydroxy group in the *trans* conformation on 4- and 4'-positions of the stilbene backbone...”, w szczególności użycie słowa „conformation” oraz zastosowana numeracja. Pomocny w lekturze całości byłby spis używanych skrótów.

W opisie przeprowadzonych badań oprócz skrótowego przedstawienia dwóch artykułów znalazła się również część dotycząca syntezy oraz badań aktywności pochodnych resweratrolu i hydroksylowanego kwasu cynamonowego. Wyniki te są niewątpliwie interesujące, nie mogą jednak podlegać ocenie jako materiał nieopublikowany. Szkoda, bo stanowiłyby on cenne wzbogacenie przedstawianego cyklu. Zwłaszcza w przypadku badań prowadzonych we współpracy z innymi ośrodkami doprowadzenie publikacji do formy finalnej bywa niekiedy czasochłonne, co uniemożliwia wykorzystanie wyników w rozprawie mającą formę cyklu publikacji.

Warto zwrócić uwagę na dużą aktywność naukową mgr Alicji Urbaniak, przejawiającą się na przykład udziałem w 7 konferencjach międzynarodowych oraz 23 krajowych, w znacznej części studenckich Szkół Chemii oraz sympozjów organizowanych przez macierzystą uczelnię Doktorantki, które niewątpliwie stanowiły cenną okazję do zdobywania doświadczeń oraz nawiązywania kontaktów naukowych. Za niedopatrzenie należy uznać brak nazwisk współautorów prezentacji konferencyjnych w przedstawionym spisie. Mgr Alicja Urbaniak jest też współautorką trzech artykułów z lat 2012-15 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, związanych z tematyką wykonywanej przez nią pracy magisterskiej (która otrzymała wyróżnienie im. Jacka Rychlewskiego przyznane przez Polskie Towarzystwo Chemiczne, a która dotyczyła badań teoretycznych, między innymi pochodnych resweratrolu). Oprócz opanowania metod chemii kwantowej (warto tu zauważyć granty obliczeniowe) Doktorantka wykazuje również zainteresowanie zagadnieniami chemii kosmetycznej – jest autorką publikacji w języku polskim, uczestniczyła w stażu naukowym w Skin Research Institute w Sztokholmie. Zestawienie aktywności publikacyjno-konferencyjnej wskazuje na stosunkowo późne ukształtowanie się zasadniczego nurtu rozprawy doktorskiej. Wszechstronność i różnorodność tematyczna są oczywiście godne pochwały, choć jednocześnie pozostaje wrażenie, że można było uzyskać więcej wyników eksperymentalnych dotyczących pochodnych resweratrolu.

Lektura artykułów składających się na rozprawę nasunęła mi kilka pytań:

1) W syntezie estrów używany był resweratrol i odpowiednie chlorki kwasowe w stosunku molowym 1:6, czyli dwukrotny nadmiar czynnika acylującego. Czy ta proporcja jest wynikiem optymalizacji? Czy testowane były również inne stechiometrie? Być może byłaby to droga do otrzymania również mono- lub diestrów, choć trudno byłoby oczekiwać regioselektywności.

2) U podstaw prezentowanych badań legła idea, w myśl której estryfikacja miała ułatwić transport resweratrolu przez błony komórkowe. Tymczasem wyniki badań aktywności

antyproliferacyjnej wskazały, że najskuteczniejsze okazały się krótkołańcuchowe estry alkilowe, a zatem nie pochodne najbardziej lipofilowe. Jak można by to wyjaśnić? Czy próbowano ustalić, w jakiej formie resweratrol był obecny w komórkach, nadal zestryfikowanej czy zhydrolizowanej?

3) Czy w syntezie heksametylostilbenu (związek 16, publikacja 2) powstaje jedynie izomer *trans*?

4) Czy znane są chiralne triestry resweratrolu, czy w syntezie testowane były chiralne chlorki kwasowe? Interesujące byłoby porównanie aktywności biologicznej odpowiednich stereoizomerów.

5) Czy podejmowane były próby syntezy estrów mieszanych, zawierających różne rezty kwasowe? Oczywiście użycie w syntezie mieszaniny dwóch chlorków kwasowych może prowadzić do sześciu różnych triestrów, jednak w przypadku różnej reaktywności substratów część produktów mogłaby powstawać z niższą wydajnością, co ułatwiłoby rozdział.

Pytania te wynikają z potencjału, jaki tkwi w opisanej w przedstawionych artykułach procedurze syntetycznej, wskazując na jej uniwersalność. Podsumowując, przedstawiony cykl złożony z dwóch publikacji zawiera liczne elementy nowości naukowej, co powala na pozytywną ocenę rozprawy. Jej Autorka uzyskała szereg wartościowych wyników, a szczególnie cennym osiągnięciem jest opracowanie procedury syntezy estrów resweratrolu z użyciem reaktra mikrofalowego. Doktorantka zdobyła wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu chemii organicznej, posiadała również umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wszelkie wymagania stawiane tego typu opracowaniom określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, Dz.U. z 2016 poz. 882) i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Alicji Joanny Urbaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Wójczińska