



Warszawa, 28.10.2019

Dr hab. Wojciech P. Ozimiński

woziminski@wum.edu.pl

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Doroty Jarmużek pt.: „Przemiany wybranych statyn syntetycznych zachodzące pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego”**

Rozprawa doktorska została zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki, prof. UAM, w roli promotora oraz dr Tomasza Siodły w roli promotora pomocniczego. Część pracy została wykonana w czasie stażu naukowego w ramach programu Erasmus+ w Instytucie Ruder Bosković w Zagrzebiu na Chorwacji. W części obliczeniowej wykorzystywana była infrastruktura komputerowa PL-Grid.

Rozprawa o objętości całkowitej 218 stron składa się ze spisu treści, wykazu skrótów i oznaczeń, streszczeń w języku polskim i angielskim, Wprowadzenia, 54-stronicowej Części Literaturowej, opisu celów pracy oraz 58-stronicowego opisu Wyników i Dyskusji wraz z podsumowaniem ważniejszych osiągnięć rozprawy. Dalej następuje Podsumowanie i Wnioski oraz Część Eksperymentalna zawierająca opisy warunków przeprowadzania doświadczeń. Całość dopełniają 204 odnośniki literaturowe oraz spisy rysunków, wykresów, tabel, a także załączniki zawierające schematy aparatury oraz kolorowe, trójwymiarowe modele badanych cząsteczek. Dobrym pomysłem okazała się usztywniona, zafoliowana wkładka dodana luźno do rozprawy, zawierająca wzory strukturalne badanych cząsteczek. Stanowiła ona nieocenioną pomoc w trakcie lektury.

Statyny, będące przedmiotem badań niniejszej rozprawy, są to związki chemiczne pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego będące inhibitorami reduktazy HMG-CoA, tak więc wpływają one na kluczowy etapu szlaku syntezy endogennego cholesterolu. Na temat statyn narosło wiele nieporozumień i stereotypów, jak choćby ten o ich dużej szkodliwości. Są



obarczone licznymi działaniami niepożądanymi, łącznie z rzadko występującą rabdomiolizą, ale też posiadają wielokierunkowe działanie lecznicze. Ich zastosowanie w danym przypadku powinno być zawsze wynikiem kalkulacji potencjalnego efektu leczniczego i ryzyka. Warto zwrócić uwagę, że statyny naturalne występują dość powszechnie w grzybach, np. w dostępnym w sprzedaży boczniku ostrygowatym. W obecnych czasach gdy choroby układu krążenia spowodowane hipercholesterolemią są odpowiedzialne na wiele przedwczesnych zgonów, statyny i ich przemiany stanowią ważny i wart podjęcia temat działalności badawczej.

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu promieniowania elektromagnetycznego na wybrane statyny syntetyczne: fluwastatynę (FLV), rosuwastatynę (RSV) oraz pitawastatynę (PTV). W przypadku FLV i PTV badana była fotostabilność, a więc wpływ promieniowania UV-VIS, natomiast w przypadku RSV – degradacja pod wpływem promieniowania jonizującego. Literaturowe badania dotyczące fotostabilności PTV są dość skąpe, natomiast w przypadku FLV występują rozbieżności w postulowanych mechanizmach. Z kolei RSV, nazywana też „superstatyną” ze względu na dużą siłę działania, jest przepisywana w coraz większych ilościach, co wiąże się z koniecznością poszukiwania skutecznych form jej degradacji, w celu zapobieżenia skażeniu naturalnych zbiorników wodnych. Należy więc stwierdzić, że wybór przez Doktorantkę tych właśnie statyn do badań, był właściwy. Streszczenia, zarówno w języku polskim jak i angielskim zawierają wyczerpujący i zwięzły opis przeprowadzonych badań, chciałbym jednak prosić o uściślenie w kwestii skażenia statynami wody pitnej. W wersji polskiej mowa jest o „niektórych regionach USA”, natomiast w wersji angielskiej pada nazwa „Canada”.

Część literaturowa zawiera jasny i wyczerpujący opis odkrycia statyn, ich budowy, farmakologii wraz z rysunkami pokazującymi statyny zadokowane w kieszeni wiążącej enzymu HMG-CoA. Dalej następuje szczegółowy opis będących przedmiotem niniejszej rozprawy statyn syntetycznych: FLV, PTV i RSV oraz analiza znanych z literatury opisów mechanizmów rozpadu statyn pod wpływem promieniowania UV-VIS oraz jonizującego. Moje drobne uwagi dotyczące tej części rozprawy. W rozdziale 1.2 „Budowa statyn” razi mnie sformułowanie „pierścień dekalinowy”. Nie jest to duży błąd, ale ponieważ dekalina składa się z dwóch pierścieni, należy jednak mówić o „pierścieniach” albo ewentualnie „jednostce dekaliny”. W rozdziale 1.3.1. „Charakterystyka statyn” stosowane są, być może dla urozmaicenia, określenia: hydrofilowy, hydrofobowy, lipofilowy i lipofobowy. Tekst czytałoby



się łatwiej gdyby ograniczyć się albo do hydro(filu i fobo)wości albo do lipo(filu i fobo)wości. W rozdziale 1.4.1 „Cholesterol” napisano, że w latach 60. XIX wieku był związkiem ten obiektem zainteresowania wielu grup. Rozumiem, że chodzi raczej o wiek XX. Ciekawostką jest fakt, iż cholesterol jest swoistym rekordzistą w dziedzinie nagród Nobla, gdyż przyznano ich za jego sprawą aż 13 ! Trudności w ustaleniu jego budowy wynikają m.in. z tego iż posiada on aż 8 centrów chiralnych, tak więc jego strukturę ustalono poprawnie dopiero w roku 1955. W rozdziale Cele pracy w jasny i przejrzysty sposób opisany jest kontekst badań, cele pracy oraz motywacja do podjęcia tych badań.

Rozdział Wyniki i Dyskusja zawiera opis badań własnych doktorantki. W Rozdziale 2.1 Właściwości fotofizyczne FLV i PTV znajdujemy opis pomiarów absorbancji UV-VIS przy różnych stężeniach FLV i PTV oraz różnej długości fali. Chciałbym w tym miejscu zapytać jaka może być przyczyna występowania dwóch punktów izobestycznych dla FLV, podczas gdy PTV ma tylko jeden, a przecież obie cząsteczki mają podobną budowę (jednoprotonowy kwas) ? W kolejnym podrozdziale znajdujemy opis pomiarów molowego współczynnika absorpcji i wydajności kwantowej procesu fotodegradacji, który w przypadku PTV okazał się znacznie mniejszy niż dla FLV. Dalej następuje opis zastosowania femtosekundowej spektroskopii absorpcji przejściowej dla zbadania mechanizmu reakcji fotodegradacji FLV i PTV. Przeprowadzone pomiary pozwoliły określić rzędy reakcji oraz stałe szybkości. Doktorantka zastosowała następnie technikę nanosekundowej fotolizy błyskowej w warunkach tlenowych i beztlenowych, dla uzyskania dodatkowych danych na temat mechanizmu fotolizy PTV. Stwierdzono, że zarówno FLV jak i PTV we wzbudzonych stanach singletowych ulegają przekształceniu do długożyjących związków pośrednich będących prekursorami ostatecznych produktów fotodegradacji. Następnie wyznaczono wydajność generowania tlenu singletowego, która dla FLV wynosiła praktycznie zero, co potwierdziło brak tworzenia się wzbudzonego stanu trypletowego FLV. W rozdziale zatytułowanym trochę myląco „Wyznaczenie wydajności kwantowej procesu fluorescencji statyn”, wyznaczono czas życia fluorescencji PTV, który dobrze zgadza się z wyznaczonym uprzednio czasem życia singletowego stanu wzbudzonego. W Rozdziale 2.2 zatytułowanym „Właściwości fotochemiczne fluwastatyny i pitawastatyny” znajdujemy opis analizy chromatografii ciekowej produktów fotodegradacji statyn. Wydaje się, że nazwa podrozdziału byłaby bardziej trafna gdyby zamiast „fotochemiczne” wpisać „produktów fotodegradacji”. Na podstawie analizy UV-VIS oraz



MS/MS zidentyfikowano dwa produkty rozpadu FLV (z których jeden jest mieszaniną diastereoizomerów) oraz jeden PTV (mieszanina diastereoizomerów). W przypadku PTV Doktorantka postuluje inną strukturę produktu rozpadu niż znana z literatury, którą to hipotezę wspiera niższą energią tego związku obliczoną metodami kwantowochemicznymi. Warto podkreślić, że w kolejnych rozdziałach Doktorantka modelowała mechanizmy reakcji prowadzące do obu możliwych fotoproduktów PTV. Dalej następuje kluczowy chyba rozdział pracy 2.3 zatytułowany Przemiany fotochemiczne statyn, w którym znajdujemy szczegółowy opis mechanizmów fotodegradacji FLV i PTV. Lektura tego rozdziału nie jest łatwa ze względu stopień złożoności samego zagadnienia, mnogość symboli i występujących tu struktur, ale należy podkreślić, że Doktorantka postarała się przedstawić ten złożony materiał w czytelnej i jasnej formie. Modelowanie stanów wzbudzonych przeprowadzone zostało głównie w oparciu o metodę Time-Dependent Density Functional Theory (TD-DFT) z funkcjonałem i bazą orbitali: M06/6-31G(d). Trochę niefortunne wydaje się cytowanie ref. 179 jako odnośnika do metody TD-DFT ponieważ autor cytowanej pracy koncentruje się raczej na zaletach metody CIS(D). Jednym z kluczowych etapów tworzenia fotoproduktów FLV i PTV jest reakcja elektrocykliczna zamknięcia pierścienia 6-członowego, dla której Doktorantka modelowała stan przejściowy. Niemalym pozytywnym zaskoczeniem było dla mnie to, że Doktorantka zastosowała trudną w użyciu ale za to dającą wiarygodne wyniki metodę teoretyczną CASSCF w badaniu możliwej drogi relaksacji stanu wzbudzonego FLV stosując uproszczone modele statyny zawierające tylko kluczowe elementy badanego układu w celu zredukowania bardzo długich czasów obliczeń. Bardzo dobrym pomysłem było także zastosowanie cząsteczki wody jako pomocnika w procesie transferu protonu w związku pośrednim FLV\_A.11 prowadzące do fotoproduktu FP<sub>FLV\_1</sub>. Dodanie takiej cząsteczki wody znacznie obniża energię aktywacji i prowadzi do uzyskania bardziej wiarygodnych danych kinetycznych dla środowiska wodnego. Na stronie 115 czytamy, że przebadano dwa konformery FLV. Jakim polem siłowym i jakim oprogramowaniem uzyskano te dwa konformery? Na stronie 116 czytamy, że ze względu na niższą energię konformera A został on użyty w dalszych badaniach ale pod Schematem 2.3.5 jest podpis – droga B. Czy ten podpis jest błędny? Również dla drugiego produktu rozpadu FLV, będącego w istocie mieszaniną diastereoizomerów zostały przeprowadzone szczegółowe rozważania poparte obliczeniami kwantowo-chemicznymi.



W przypadku PTV postulowany mechanizm fotodegradacji jest podobny do opisanego wcześniej dla FLV, w tym przypadku mamy tylko jeden produkt rozpadu w postaci mieszaniny diastereoizomerów. Doktorantka zastosowała podobnie jak dla FLV uproszczone modele cząsteczki PTV dla modelowania reakcji fotochemicznych. Jednak zastosowanie metody CASSCF nie powiodło się co Doktorantka skomentowała „Otrzymane wyniki były niezadowolające”. Czy można poprosić o więcej szczegółów na czym polegała w tym przypadku porażka metody CASSCF? Strukturę PTV\_CI/AC otrzymano ostatecznie na poziomie TD-M06/6-31G(d)//CIS/6-31G(d). Dalej modelowany był stan przejściowy zamknięcia pierścienia oraz przeniesienia protonu z pomocą cząsteczki wody prowadzący do znanego z literatury fotoproduktu FP<sub>PTV</sub>\_1a. Na tym właściwie Doktorantka mogłaby poprzestać, ale ambitnie podjęła się modelowania drogi reakcji prowadzącej do zaproponowanego przez siebie wcześniej, niżej-energetycznego produktu FP<sub>PTV</sub>\_1b. Wymagało to przeprowadzenia trój etapowej drogi reorganizacji pierścienia trój-członowego do pierścienia sześć-członowego połączonego dodatkowo mostkiem. W celu skrócenia czasu obliczeń zastosowano uproszczone modele PTV ograniczające się do najważniejszych elementów układu. Dalej, na stronie 125 znajdują się rozważania o wadach i zaletach metod typu restricted i unrestricted w obliczeniach dla układów otwartopowłokowych. Drobną uwagą: określenie o „większej wielokrotności stanów spinowych” powinno być zastąpione przez „wyższej multipletowości”. Doktorantka pisze, że wszystkie próby optymalizacji cząsteczek modelowych jako singletowych dwurodników nie powiodły się i że prawdopodobną przyczyną było wystąpienie zanieczyszczenia spinowego (spin contamination). Na czym polegały niepowodzenia w optymalizacji geometrii – czy wystąpiły np. oscylacje i nie można było uzyskać zbieżności geometrii? Zanieczyszczenie spinowe jest to zjawisko charakterystyczne dla metod typu unrestricted. Czy podjęte były próby optymalizacji metodą typu Restricted Open Shell? A może przyczyną niepowodzenia była niestabilność funkcji falowej? Czy była ona badana? Doktorantka uzyskała jednak informacje o energiach dwurodników wykonując obliczenia typu Single Point dla geometrii zoptymalizowanych dla stanów trypletowych. Według jakiej metodologii przeprowadzone były obliczenia Single Point dla singletu oraz optymalizacje dla trypletu? Pomimo opisanych problemów doktorantce udało się uzyskać spójny obraz przemian chemicznych PTV prowadzących do postulowanego, nowego fotoproduktu.



Jako, że na co dzień zajmuję się obliczeniami kwantowo-chemicznymi, muszę stwierdzić, że przeprowadzone przez doktorantkę modelowanie mechanizmów reakcji w stanach wzbudzonych należy do najtrudniejszych zagadnień chemii obliczeniowej. W zawiązku z tym jestem pełen uznania, że doktorantce udało się osiągnąć cel i uzyskać spójny obraz modelowanych reakcji.

Warto w tym miejscu podkreślić, że dla FLV badania Doktorantki zostały pozytywnie zweryfikowane przez recenzentów prestiżowego czasopisma *Physical Chemistry Chemical Physics*, gdzie Doktorantka w 2017 roku opublikowała artykuł (numer ref. 168). Badania własne kończy rozdział 2.4 Wpływ promieniowania jonizującego na trwałość statyn w którym Doktorantka analizuje zagadnienie radiolizy RSV. Określono optymalną dawkę pochłoniętą taką aby zapobiec powstawaniu wtórnych produktów radiolizy. W oparciu o metody LC-DAD oraz LC-MS zidentyfikowano 5 produktów rozpadu. Na podstawie widm MS/MS określono prawdopodobne miejsca ataku rodnika hydroksylowego. Otrzymane wyniki korespondują z wynikami literaturowymi uzyskanymi dla FLV.

W dalszej części pracy doktorskiej znajduje się jeszcze rozdział „Ważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej”, w którym w przejrzysty sposób wymienione są najważniejsze uzyskane rezultaty, oraz rozdział Podsumowanie i Wnioski. Pod koniec tego rozdziału zawarte jest stwierdzenie, że warto byłoby podjąć badania mające na celu wyizolowanie produktów radiolizy RSV i określenia ich właściwości fizykochemicznych. Myślę, że byłaby to wartościowa kontynuacja badań zawartych w pracy doktorskiej. Rozprawę kończy rozdział zatytułowany Część eksperymentalna, zawierający opis metodologii przeprowadzenia eksperymentów i obliczeń.

Cała praca napisana jest przejrzystym, jasnym językiem, czyta się ją dobrze i jest zrozumiała, mimo trudnego miejscami materiału. Jednak znalazła się w niej pewna liczba drobnych błędów, literówek i przeinaczeń, które chciałbym w tym miejscu wymienić, uważając, że jest to obowiązkiem recenzenta. Str. 5: pjSIM\_1 – pjSIM\_7 znane z literatury produkty degradacji **rosuwastatyny** (powinno być: **simwastatyny**). Str. 7: 3-hydroksy-3-**metyloglutrylo** (powinno być 3-**metyloglutarylo**), str. 19: **damskie** hormony (powinno być: **żeńskie**), str. 33: **emulację** tłuszczu (powinno być: **emulgację**), str. 41: grupa badawcza **Novaris** (powinno być: **Novartis**), str. 41: **izopreino**we (powinno być: **izopreno**we), str. 45: **laktonizacja** (powinno być: **laktonizacja**), str.50: produkty **wtóre** (powinno być: **wtórne**), str.



50: Mechanizm  $6\pi$ -elektrocyklizacji (powinno być: **elektrocyklizacji**), str. 53: (Schemat 1.6.4). Zgodnie (niepotrzebna kropka, zgodnie z małą literą), str. 66: **energia** stanu trypletowego  $3ppRSV_1^*$  wynosiła  $E_T=67$  kcal/mol (powinno być **energia względem stanu podstawowego**), str. 67: Tryptofan (**Tpr**) – powinno być: **Trp**. Str. 89: rezultatów otrzymanych niniejszej rozprawie – brak „w”, str. 90: zbędna kropka po „które”, str. 110: W oparciu o **trzymane** wyniki (powinno być **otrzymane**), FluoTime 300 określany jest na str. 161 jako „spektrofotometr fluorescencyjny”, a na stronie 162 jako „spektrofluorymetr fluorescencyjny”, str. 169: funkcjonal  $6-31G(d)$  – (powinno być baza orbitali  $6-31G(d)$ ). Jednak umieszczenie tu ref. 202 wskazuje, że powinien w tym miejscu znaleźć się funkcjonal M06 zamiast bazy), str. 170: N-liczba odpowiadających sobie **atomowo** (powinno być: **atomów**).

Wymienione przeze mnie błędy, krytyczne komentarze i pytania w niczym nie umniejszają mojej bardzo pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej. Pani mgr Jarmużek wykazała się znajomością wielu nowoczesnych instrumentalnych technik analitycznych, a dodatkowo podniosła wartość naukową swoich badań poprzez zastosowanie zaawansowanych metod kwantowo-chemicznych modelowania molekularnego. Wykonane przez doktorantkę badania z pewnością stanowią ważny wkład w wyjaśnieniu mechanizmów fotodegradacji statyn syntetycznych i przez to mogą zostać wykorzystane dla zapewnienia lepszej stabilności zawierających statyny produktów leczniczych. Także badania dotyczące radiolizy statyn mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w opracowaniu metod usuwania tej grupy leków ze ścieków komunalnych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Doroty Jarmużek stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku i wnioskuję o dopuszczenie mgr Doroty Jarmużek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wielość i zaawansowanie technik eksperymentalnych i teoretycznych, którymi posługiwała się Doktorantka, bogaty materiał eksperymentalny i teoretyczny, a także z uwagi na ogólnie wysoki poziom naukowy prezentowanej rozprawy doktorskiej, wnoszę o jej wyróżnienie.

*Wojciech Ormianowski*