



Poznań, 18 października 2019

**dr hab. inż. Joanna Kobus-Cisowska**

Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

## Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: mgr Dorota Jarmużek

Tytuł: Przemiany wybranych statyn syntetycznych zachodzące pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego

wykonanej w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych na Wydziale Chemii,

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

pod kierunkiem

prof. UAM dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki (promotor)

i dr. Tomasza Siodła (promotor pomocniczy)

### 1. Dobór i znaczenie tematu

Badania epidemiologiczne prowadzone w Polsce, wskazują, że hipercholesterolemia jest najczęstszym czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. Leczenie tego zaburzenia w Polsce jest nieefektywne zarówno w odniesieniu do pierwotnej, jak i wtórnej profilaktyki. Nieskuteczność leczenia jest spowodowana wieloma powodami. Większość osób z hipercholesterolemią, czy w ogóle dyslipidemią, pozostaje niezdiagnozowana i nieświadoma choroby. Część osób z rozpoznanymi zaburzeniami lipidowymi nie stosuje żadnego leczenia lub wdrożona terapia jest u nich nieefektywna. Niewyjaśnienie przez lekarza znaczenia obecności czynnika ryzyka, jakim jest hipercholesterolemia, często przyczynia się do zaprzestania przez pacjenta początkowo wdrożonego leczenia. Wreszcie niemożność osiągnięcia celów terapeutycznych mimo prowadzonej farmakoterapii wynika ze stosowania zbyt słabych leków.

Ważnym elementem w ocenie jakości leków jest ocena ich aktywności terapeutycznej podczas przechowywania. Znaczna liczba farmaceutyków jest wrażliwa na działanie promieniowania elektromagnetycznego, głównie z zakresu promieniowania ultrafioletowego i światła widzialnego (UV-Vis). Konsekwencją fotochemicznego procesu degradacji leków jest



najczęściej zmiana ich aktywności terapeutycznej. Światło może znacznie wpłynąć na właściwości wielu produktów farmaceutycznych, zarówno na etapie ich produkcji, przechowywania jak i dawkowania. W związku z tym ważne jest aby fototrwałość leków została określona indywidualnie dla składnika aktywnego, całego preparatu jak i produktów w opakowaniu. Analiza produktów rozkładu fotochemicznego jest niezbędna w celu ustalenia i stosowania bezpiecznej i skutecznej terapii.

Statyny znajdują zastosowanie w leczeniu hiperlipidemii, zarówno w monoterapii, jak i leczeniu skojarzonym. Zmniejszają liczbę incydentów wieńcowych, zgonów spowodowanych chorobą wieńcową, udarów mózgu i zabiegów rewaskularyzacyjnych. Są dobrze tolerowane i metabolizowane. Wpływ statyn na redukcję liczby incydentów sercowo-naczyniowych jest spowodowany nie tylko przez działanie na gospodarkę lipidową, ale również poprzez opóźnienie tworzenia się skrzepu w naczyniach krwionośnych. Statyny występują w środowisku naturalnym jako produkty fermentacji grzybów pleśniowych, a także w produktach żywnościowych, na przykład w jadalnym grzybie bocznaku ostrygowatym i sfermentowanym czerwonym ryżu, lecz w leczeniu stosowane są formy syntetyczne takie jak fluwastatyna, rosuwastatyna i pitawastatyna.

W tej tematyce badawczej mieści się też przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Doroty Jarmużek, której najważniejszym celem była ocena wpływu promieniowania elektromagnetycznego o różnej energii na fluwastatynę, pitawastatynę i rosuwastatynę.

## 2. Ocena formalna pracy

Przedłożona do recenzji praca doktorska stanowi 218 stronicowe opracowanie ze standardowym podziałem na poszczególne rozdziały, przy czym kolejność prezentowania rozdziałów nie jest typowa, lecz jest zgodna ze stylem uznanych czasopism naukowych. W pracy zawarto: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wprowadzenie, część literaturową, cel pracy, wyniki i dyskusję zakończoną podsumowaniem i wnioskami, materiały i metody jako część eksperymentalną oraz spis literatury.

Rozdział zatytułowany przegląd literatury składa się z 7 części. W pierwszych 3 częściach Autorka przedstawia rys historyczny oraz budowę i właściwości farmakologiczne i farmakokinetyczne statyn. W kolejnej części opisuje ich aktywność biologiczną i skupia się na funkcji, metabolizmie cholesterolu w organizmie oraz mechanizmie działania statyn wobec cholesterolu. Piąty punkt części literaturowej dotyczy charakterystyki wybranych statyn jako



popularnych leków stosowanych w pierwotnej i wtórnej ochronie przed chorobą niedokrwienną serca, natomiast szósty stanowi zestawienie aktualnego stanu wiedzy w zakresie oddziaływania promieniowania świetlnego na statyny. Ostatni punkt poświęcony jest opisowi wpływu działania promieniowania jonizującego na statyny. Cel pracy został sformułowany zrozumiale i koreluje z tematem rozprawy doktorskiej. W kolejnym rozdziale tj. „Wyniki i dyskusja” Autorka opisała uzyskane wyniki badań związane z oceną wpływu promieniowania elektromagnetycznego na wybrane statyny syntetyczne: fluwastatynę, rosuwastatynę oraz pitawastatynę. Część wynikową Autorka zakończyła wskazując na ważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej, gdzie zamieściła 14 punktów stanowiących syntetyczne podsumowanie rezultatów uzyskanych w pracy. Kolejny rozdział stanowi podsumowanie i wnioski. Następny rozdział to część eksperymentalna, zawierająca opis zastosowanych w pracy materiałów i metod. Autorka w sposób szczegółowy opisała wykorzystane zastosowane w pracy metody badawcze zarówno obliczeniowe jak i instrumentalne. Spis literatury stanowią 204 pozycje obejmujące głównie literaturę światową i pojedyncze pozycje w języku polskim. Na uwagę zasługuje fakt, że sama Autorka jest współtwórcą oryginalnej pracy naukowej w poruszanej w pracy doktorskiej tematyce. Spis literatury został przygotowany starannie i zgodnie z zasadami edytorsko-redakcyjnymi.

### **Ocena Merytoryczna pracy**

Przedstawiona do oceny praca ma typowo chemiczny charakter, który powiązany jest z naukami farmaceutycznymi, a wyniki pracy mogą w efekcie wspomóc terapię chorób sercowo-naczyniowych poprzez udoskonalanie leków zawierających statyny. Mimo iż praca z zasady ma chemiczny charakter, Autorce udało się bardzo dobrze wpleść zagadnienia związane z następstwami nieprawidłowego żywienia, zagadnieniami farmaceutycznymi związanymi z leczeniem chorób sercowo-naczyniowych jak i związanymi z zagadnieniami ochrony środowiska (przemiany statyn w wodach gruntowych). Pozwoliło to zobrazować z jednej strony możliwości i wiedzę Autorki, z drugiej zaś wykazać, że dziś nauki chemiczne, farmaceutyczne, środowiskowe oraz nauki z zakresu profilaktyki zdrowia człowieka uzupełniają się wzajemnie. Dla młodego naukowca pozyskanie wiedzy z kilku dyscyplin, opracowanie warsztatu badawczego, przeprowadzenie eksperymentów, ich opisanie i interpretacja to trudne zadanie, a jego realizacja i efekt w postaci przedłożonej do recenzji pracy świadczy o dużym wkładzie intelektualnym Autorki, a także chęci pozyskania nowej wiedzy.



## Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

W rozdziale przegląd literatury Autorka skupiła się na charakterystyce statyn, ich wpływie na obniżenie poziomu cholesterolu, metabolizmie i oddziaływaniu na nie warunków środowiskowych. Autorka wyjaśniła że farmaceutyki te wykorzystywane są w leczeniu choroby niedokrwiennej serca i działają jako inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3- metyloglutarylo koenzymu A (HMG-CoA), enzymu katalizującego kluczowy etap biosyntezy cholesterolu. Autorka przedstawiła, że związki te mogą być produktami fermentacji grzybów i pleśni (statyny naturalne, półsyntetyczne) lub też mogą być otrzymane na drodze syntezy chemicznej (statyny syntetyczne). W tym miejscu Autorka nie przedstawiła szerzej zagadnienia związanego ze statynami naturalnymi, co dodatkowo mogłoby wzbogacić część literaturową pracy. Zabrakło też informacji w jaki sposób statyny obecne w żywności mogą wchodzić w interakcje ze statynami syntetycznymi wykorzystywanymi w terapii. Doktorantka bardzo obszernie skupiła się na informacjach dotyczących statyn syntetycznych, będących przedmiotem pracy, które są wrażliwe na działanie promieniowania elektromagnetycznego. Niska fotostabilność statyn związana jest najprawdopodobniej z obecnością licznych wiązań wielokrotnych i pierścieni aromatycznych w ich strukturze. Znanych jest szereg produktów fotodegradacji statyn syntetycznych. Autorka scharakteryzowała syntetyczne statyny w zakresie ich zróżnicowania strukturalnego, wskazując że każda z nich posiada charakterystyczny heteroaromatyczny pierścień. W podrozdziale zatytułowanym efekty uboczne działania statyn, Autorka zebrała opisane w literaturze działania niepożądane, które mogą wystąpić po leczeniu z udziałem statyn. Dalej, Autorka przedstawiła budowę cholesterolu, wskazała jego źródła oraz wyczerpująco zobrazowała w jaki sposób następuje jego biosynteza. W szczególności cennym elementem pracy jest precyzyjny opis mechanizmu działania statyn w blokowaniu szlaku syntezy cholesterolu. Autorka w kolejnym rozdziale szczegółowo odniosła się do aktualnego stanu wiedzy z zakresu oddziaływania promieniowania świetlnego z lekami, co ma istotne znaczenie w przypadku efektywności leczenia statynami. W tym miejscu powołuje się na liczną literaturę, w której przedstawiła nie tylko badania dotyczące fotostabilności statyn w kontekście ich degradacji, ale również opisała badania skupiające się na określeniu potencjału fototoksycznego. Autorka wskazała że przemiany rosuwastatyny oraz atorwastatyny zachodzące pod wpływem promieniowania świetlnego zostały szczegółowo zbadane i opisane w literaturze. Jednocześnie Autorka wskazała, że w przypadku pitawastatyny niewiele jest dostępnych danych na ten temat, a w odniesieniu do fluwastatyny dane literaturowe są niespójne. Na uwagę zasługuje fakt, iż Autorka w przeglądzie literatury skupiła się na konkretnych przykładach literaturowych, a nie na wiedzy encyklopedycznej, co oceniam wysoko.



Autorka rozprawy wyznaczyła i sformułowała główny cel, którym było zbadanie wpływu promieniowania elektromagnetycznego na wybrane statyny syntetyczne: fluwastatynę, rosuwastatynę oraz pitawastatynę. Celem pracy było przeprowadzenie szczegółowych badań kinetycznych procesu ich fotodegradacji. Dodatkowo Autorka w pracy skupiła się zarówno na określeniu właściwości fotofizycznych, jak i zbadaniu pierwotnej fotochemii badanych statyn. Co warto podkreślić, Autorka do określenia mechanizmów przemian związków zastosowała zarówno metody instrumentalne jak i obliczeniowe. Istotę rozprawy stanowiły również badania wpływu promieniowania jonizującego na rosuwastatynę. Ocena i badania fototrwałości statyn, a także poznanie mechanizmów reakcji jakim te związki ulegają pod wpływem działania światła ma ogromne znaczenie w poznaniu charakteru chemicznego zachodzących procesów. Uzyskane dane mogą być pomocne w określeniu czynników wpływających na fototrwałość statyn, a także na możliwość wystąpienia interakcji z innymi lekami. Ocena wpływu promieniowania jonizującego na degradację statyn oraz charakterystyka powstających produktów może stanowić podstawę badań prowadzących do rozwinięcia nowych skuteczniejszych technik oczyszczania ścieków. W mojej ocenie w tym rozdziale (cel pracy), powinny być przedstawione skonkretyzowane cele szczegółowe bądź hipotezy cząstkowe, które zobrazowałyby mnogość wykonanych prac i analiz, ponadto ułatwiły by interpretację tekstu w zakresie badań które z jednej strony (w części pierwszej) dotyczyły fluwastatyny i pitawastatyny, a w drugiej części badania obejmowały wpływ promieniowania jonizującego na rosuwastatynę. Sprecyzowane i uzasadnione cele szczegółowe pozwoliłyby też na zebranie usystematyzowanych wniosków końcowych pracy.

Kolejny rozdział został zatytułowany omówienie wyników i ich dyskusja. W tym miejscu jeszcze raz chciałabym podkreślić, że wyniki badań przedstawione w pracy zostały uzyskane metodami obliczeniowymi jak również z wykorzystaniem specjalistycznej aparatury analityczno-badawczej. Ponadto szczególnym osiągnięciem w mojej opinii były badania realizowane we współpracy z naukowcami z zagranicznej jednostki badawczej (Instytut Ruder w Zagrzebiu w Chorwacji), co dodatkowo podnosi jakość prac zrealizowanych przez Doktorantkę.

Autorka stosując metody spektroskopowe wyznaczyła molowy współczynnik absorpcji roztworu wodnego fluwastatyny, a także pitawastatyny w mieszaninie rozpuszczalników woda i ACN, a także wyznaczyła wydajność kwantową procesu fotodegradacji fluwastatyny oraz pitawastatyny. W tym miejscu Doktorantka wykazała, że pitawastatyna wykazuje większą trwałość fotochemiczną. W oparciu o wyniki eksperymentów z zastosowaniem technik spektroskopii czasowo-rozdzielczej Autorka określiła czas życia fluwastatyny i pitawastatyny we wzbudzonych stanach singletowych i wyznaczyła stałe szybkości ich rozpadu. Spektroskopowe



techniki czasowo-rozdzielcze pozwoliły Autorce na stwierdzenie, że zarówno fluwastatyna jak i pitawastatyna we wzbudzonych stanach singletowych ulegają przekształceniu do długożyjących związków pośrednich. Ponadto Autorka zidentyfikowała pierwotne fotoprodukty degradacji badanych statyn i określiła struktury tworzących się fotoproduktów. Na podstawie wyznaczonych właściwości fotochemicznych i fotofizycznych badanych statyn Autorka zaproponowała schematy pierwotnych przemian fluwastatyny oraz pitawastatyny zachodzące pod wpływem promieniowania świetlnego. W tym miejscu Autorka wskazała że mimo strukturalnego podobieństwa między tymi statynami drogi ich pierwotnych przemian zachodzących pod wpływem promieniowania świetlnego różnią się między sobą. Najprawdopodobniej jest to związane z różnicami we właściwościach i strukturach stanów przejściowych biorących udział w tych przemianach. Wyniki badań realizowanych przez Doktorantkę przyczyniły się do pozyskania nowej wiedzy w zakresie szczegółowego mechanizmu tworzenia fotoproduktów z badanych statyn, co było możliwe dzięki obliczeniom kwantowo-chemicznym, co w opinii Recenzenta ma istotne znaczenie w dalszych badaniach nad statynami.

W drugiej części rozdziału wynikowego autorka skupiła się na wynikach badań uzyskanych z zastosowaniem promieniowania jonizującego w stosunku do wodnego roztworu soli wapniowej rosuwastatyny w warunkach utleniających. W tym zakresie Autorka z wykorzystaniem metod chromatograficznych zidentyfikowała powstające produkty naświetlania roztworu rosuwastatyny (5 produktów). Analiza strukturalna otrzymanych produktów pozwoliła wysunąć Autorce wnioski, że atak rodnika  $\cdot\text{OH}$  może zachodzić na nienasycony łańcuch boczny oraz na pierścień aromatyczny związku macierzystego.

W tym aspekcie stwierdzam, że uszeregowanie uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań i ich prezentacja jest logiczna, a materiał faktograficzny przedstawiony w pracy został dobrze wyselekcjonowany. Pewną trudność w analizie wyników sprawia interpretacja wykresów z uwagi na ich mało czytelną formę. Podczas publikacji wyników sugeruję dopracować wykresy ujednolicając opisy osi i przygotować je w odpowiedniej rozdzielczości.

W kolejnym rozdziale Autorka opisała wykorzystane w pracy materiały i metody. Opis metod jest bardzo skrupulatny i na tyle szczegółowy, że umożliwia, teoretycznie odwzorowanie przeprowadzonych eksperymentów. Szczególną moją uwagę, zwróciła kompleksowa analiza obejmująca metody obliczeniowe i metody instrumentalne, o czym pisałam już wcześniej. Warto zaznaczyć, że w pracy zaprezentowany jest efekt końcowy, jednak Recenzent jest świadomy faktu, że zoptymalizowanie i dopracowanie warsztatu analitycznego jest czasochłonne i wymaga wielu prób i pracy.



## Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Kolejny rozdział stanowią wnioski, których sposób zaprezentowania w mojej opinii nie został dobrze przemyślany i stanowi najslabszy element pracy. Rozdział wyniki i dyskusja został zakończony częścią nazwaną „ważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej”, które w mojej opinii są wnioskami i mogłyby być zaprezentowane w ostatnim rozdziale podsumowanie i wnioski. Jest to jednak uwaga typowo edytorska, która nie wpływa na wartość merytoryczną pracy.

Do pracy mam kilka uwag, sugestii i pytań:

Uwagi edytorskie:

1. Początek pracy stanowi streszczenie które w wersji angielskiej zawiera inne informacje niż w wersji polskiej. Przykładowo Autorka w streszczeniu polskim wskazała że „w niektórych regionach USA leki te wykryto również w wodzie pitnej”, natomiast w wersji angielskiej informacja ta dotyczy Kanady.
2. Rysunek 1.2.1. na stronie 24, rysunek 1.2.2. na stronie 25, rysunek 1.2.3 na stronie 26, jest przedstawiony bardzo ładnie i czytelnie, w treści zabrakło jednak wyjaśnienia zastosowania kolorystyki czerwonej i czarnej.
3. Str 23 wymieniając grzyby mikroskopowe (*Penicillum*) różnych gatunków należałoby stosować konsekwentnie nazewnictwo „grzyby” (grzyby mikroskopowe) a nie „pleśnie”, można by było podać ewentualnie w nawiasie „pleśnie”. Na wskazanej stronie zapisane jest *Penicilllum* i *Penicilum*, gdzie poprawnie powinno być *Penicillium*.
4. Str 27 nie ma potrzeby podawania skrótów poszczególnych statyn, gdyż skróty zostały wyjaśnione w części opisującej nazewnictwo skrótów
5. Str 29 – Zdanie „Najmniejsze powinowactwo wynoszące około 50% wykazuje prawastatyna” nie jest jasne
6. Str 39 – Rysunek 1.4.5 nie jest czytelny
7. Str 41 – Rysunek 1.5.1 – zapisane 400C nie jest temperaturą – czy nie powinno być 40°C
8. Str 41 – „Fluwastatyna wpływa na redukcję komórek nowotworowych już po ekspozycji trwającej 48 godzin” – jaka linia komórkowa była przedmiotem badań?
9. Str 51- „W wyniku ekspozycji wodnego roztworu soli FLV na światło słoneczne przez 1 dzień możliwe jest otrzymanie tych samych produktów dekompozycji związku jak pod wpływem naświetlania lampą UV przez 1 godzinę” – czy są wskazane w literaturze parametry? Np. długość fali ?



10. Str 67 – „Tlen singletowy jest jedną z głównych reaktywnych form tlenu biorących udział w uszkodzeniach cząsteczek biologicznych. Generowany przez endo- i egzogenne związki. Ponadto może on reagować z różnymi grupami biocząsteczek, np. kwasami nukleinowymi, tłuszczami nienasyconymi, czy białkami” - przydałoby się źródło literaturowe a fragment wskazany powinien być przeredagowany
11. Str 82 „Stosowane powszechnie metody oczyszczania ścieków są niewystarczające” – przydałoby się wymienić : takie jakie to metody i uzasadnić dlaczego ich skuteczność jest niewystarczająca
12. Str 83 „W związku z tym niektóre z nich m.in. simwastatyna, lowastatyna, prawastatyna oraz atorwastatyna zostały wykryte w ściekach komunalnych na poziomie  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  – powinna być podana wartość przy jednostce
13. Str 97- na wykresie opis osi jest po angielsku, powinien być po polsku
14. Str 102 – na wykresie opisy na osi powinny być w języku polskim, obecnie są po angielsku
15. Str 109 – „Grobelny i wsp., którzy zajmowali się fotochemią pitawastatyny również obserwowali fotoprodukt ....” – powinno być podane źródło numeryczne w nawiasie
16. Str 131 – Rys 2.4.3 – wykres jest mało czytelny
17. Część eksperymentalna – w opisie metod brakuje informacji ile prób/ w ilu powtórzeniach doświadczenia były wykonane
18. Str 167 – „W stosunku do obu statyn jako eluenty zastosowano 0.01 M roztwór buforu fosforanowego oraz acetonitry, przepływ wynosił 1.5 ml/min..” - czy chodzi o acetonitryl?

### Sugestie ogólne:

1. Spis literaturowy powinien być zaprezentowany w układzie skrótów polskich. Stosowanie skrótu pp (paper page) jak najbardziej odpowiada publikacjom anglojęzycznym, w prezentowanej polskojęzycznej pracy powinno być „s.”. Analogicznie skrót „Vol”.
2. Spis literatury byłby bardziej czytelny gdyby wymienione pozycje literaturowe rozpoczynały się od nazwiska autora, a nie skrótu jego imienia.
3. Autorka zawarła wiele powtórzeń metodycznych w części wynikowej, co niepotrzebnie zwiększyło objętość pracy.





## Pytania:

1. Z czego wynikał dobór rosuwastatyny do drugiej części badań związanych z zastosowaniem promieniowania jonizującego, dlaczego nie badano pozostałych statyn?
2. W jaki sposób promieniowanie jonizujące mogłoby być wykorzystane do oczyszczania ścieków? Jakie badania są niezbędne aby ocenić wydajność takiej metody i czy jej stosowanie mogłoby wiązać się ze skutkami niepożądanymi (gdyby metoda była powszechnie stosowana)?
3. Jakie interakcje z żywnością mogą mieć produkty powstające w wyniku naświetlania naturalnych statyn i czy jest możliwe prognozowanie kierunków takich przemian?

Reasumując, w mojej opinii przedłożona do recenzji praca jest bardzo interesującym i wartościowym studium z zakresu chemii o interdyscyplinarnym znaczeniu. Zastosowanie szeregu metod, często żmudnych w opracowaniu i pracochłonnych, a także widoczny przewód myślowy Autorki w trakcie realizacji pracy stanowią jej dużą wartość. Wskazówki Recenzenta należy uwzględnić na etapie publikacji wyników.

## Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko, zawarte w niej elementy nowości naukowej, bardzo szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów badawczych oraz bardzo dobre przygotowanie warsztatowe Autorki, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Doroty Jarmużek w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora i wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony. **Jednocześnie wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Chemii przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowaną nagrodą lub wyróżnieniem**

  
dr hab. Joanna Kobus-Cisowska