

Dr hab. n. farm. Łukasz Kuźma
Profesor UM w Łodzi
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź
lukasz.kuzma@umed.lodz.pl

Łódź, dn. 17.05.2023r.

RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr Sebastiana Szymańskiego pt.:

„Badanie ugrupowania podwójnego antronu w związkach pochodzenia naturalnego o znaczeniu biologicznym i farmaceutycznym”.

Rozprawa doktorska, którą miałem zaszczyt recenzować zrealizowana została przez Pana mgr Sebastiana Szymańskiego w Katedrze i Zakładzie Podstaw Nauk Chemicznych na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Praca doktorska, będąca przedmiotem mojej recenzji, została wykonana pod kierunkiem promotorskim Pani Prof. dr hab. Ireny Majerz. Niniejsza praca doktorska stanowi opis wyników zamieszczonych w trzech publikacjach w formie pełnotekstowej tematycznie obejmujących pracę doktorską. Całość poprzedzona jest streszczeniami w języku polskim i angielskim. Następnie, Doktorant w zwięzłym wprowadzeniu scharakteryzował przedmiot badawczy, którym były związki naturalne pochodzenia roślinnego, mianowicie metabolity wtórne posiadające w swojej cząsteczce ugrupowanie podwójnego antronu: hiperycyne, sennidyny oraz fagopiryny, wykryte wcześniej w roślinach z rodzaju Dziurawiec (*Hypericum*), Senes (*Senna*) oraz Gryka (*Fagopyrum*), odpowiednio. Opisał naturę chemiczną tych fitozwiązków, podając ich kluczowe właściwości farmakologiczne. W tej części rozprawy Doktorant podkreślił zasadność współcześnie stosowanych komputerowych metod obliczeniowych niezbędnych do projektowania nowych leków, w którym to procesie istotne jest poznanie właściwości fizykochemicznych analizowanych molekuł, mających stanowić substancje czynne współcześnie używanych postaci leków. Komputerowe narzędzia pozwalają teoretycznie projektować nowe struktury oraz symulować ich oddziaływania wewnątrz- i międzycząsteczkowe.

W odniesieniu do wybranych do badań przez Pana mgr Szymańskiego fitozwiązków z ugrupowaniem podwójnego antronu do momentu opublikowania przez Niego wyników analiz komputerowych tych molekuł, mimo stosunkowo dobrze poznanych właściwości farmakologicznych tych substancji, istniała w piśmiennictwie luka w obszarze obejmującym ich struktury przestrzenne uwzględniające możliwe konformery i ich energetyczność, a także oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe.

Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że wybór obiektu badawczego przez Pana mgr Sebastiana Szymańskiego, jak i zastosowanych metod, są w mojej ocenie w pełni uzasadnione.

Celem podjętych przez Pana mgr Szymańskiego badań było określenie komputerowymi technikami *in silico* struktury przestrzennej i elektronowej hiperycyny, sennidyn i fagopiryn, jak również określenie parametrów fizykochemicznych, interakcji wewnątrzcząsteczkowych, a także symulacja widm IR oraz UV-Vis.

Na dorobek naukowy wchodzący w zakres pracy doktorskiej Pana mgr Sebastiana Szymańskiego składają się trzy publikacje o sumarycznym wskaźniku Impact Factor (wg. najnowszych danych bibliometrycznych) wynoszącym **14,898**.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana Mgr Sebastiana Szymańskiego stanowi szczegółowy opis wyników zamieszczonych w trzech wchodzących w zakres niniejszej pracy publikacjach. Całość poprzedza strona tytułowa, spis treści wraz ze spisem rysunków i tabel oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. W rozdziale „Wprowadzenie” Doktorant szczegółowo wprowadza w tematykę rozprawy podkreślając znane właściwości analizowanych molekuł, a mianowicie hiperycyny, fagopiryn oraz sennidyn.

Do badań Pan mgr Sebastian Szymański wykorzystał oprogramowanie Gaussian 16, za pomocą którego wyznaczył strukturę przestrzenną i przeprowadził analizę konformacyjną wybranych do eksperymentów fitozwiązków. Do analizy Quantum Theory of Atoms In Molecules (QTAIM) Doktorant wykorzystał program AIMALL, zaś do badań anizotropii ładunku użył programu ACID. Analizę widm elektronowych wykonał w programie ADF.

W części wynikowej rozprawy doktorskiej Pan Mgr Sebastian Szymański kolejno opisuje wyniki symulacji struktur hiperycyny, sennidyn oraz fagopiryn.

Dla cząsteczki hiperycyny Doktorant podkreślił istotny wpływ podstawników na budowę przestrzenną tego fitozwiązku, jak również charakter wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań w analizowanej strukturze. Obszary cząsteczki, w których obecne są dwie grupy hydroksylowe

(obszar zatoki), czy dwie grupy hydroksylowe w sąsiedztwie grupy karbonylowej skutkuje pojawieniem się wiązań wodorowych. Wiązania te mogą wpływać stabilizująco na cząsteczkę hiperycyny, co potwierdził analizą NCI oraz QTAIM. Z analizy NCI wynika, że w obrębie układu policyklicznego hiperycyny występują oddziaływania przyciągające, w obrębie zatoki oraz w obszarze grup karbonylowych – oddziaływania odpychające, a w obrębie grup metylowych – oddziaływania o charakterze dyspersyjnym. Analizą QTAIM Pan mgr Szymański wykazał, że o ile dwie grupy metylowe oraz wiązania wodorowe w obszarze zatoki zaburzają planarność cząsteczki, to grupy karbonylowe przy atomach węgla C-7 i C-14 przywracają płaskość tej struktury. Z analiz parametrów aromatyczności HOMA, jak również w oparciu o kryterium NICS, a także metody SCAN w programie AROMA wynika, że delokalizacja ładunku ma miejsce w całym obszarze policyklicznym i brak w nim obecności pierścieni pustych - niearomatycznych.

Kolejną, badaną przez Pana mgr Sebastiana Szymańskiego grupą związków naturalnych z ugrupowaniem podwójnego antronu są sennidyny. W tych strukturach jest możliwość rotacji względem wiązania C-C łączącego ugrupowania pojedynczego antronu.

W rezultacie przeprowadzonej analizy konformacyjnej Doktorant otrzymał 21 struktur. W przypadku konformeru sennidyny A o najniższej energii zaobserwowano jedynie oddziaływania w obszarze antronowym. W konformerach o pośrednich wartościach energii obserwuje się oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe podstawników w obszarze zatoki z podstawnikami z obszaru antronowego.

Sennidyna B może występować w postaci czterech konformerów. W strukturze o najniższej energii nie odnotowano wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych z grupami karboksylowymi, a ugrupowania antronowe nie leżą równolegle.

Dla sennidyny C Pan mgr Szymański zaproponował sześć konformerów. Struktura o najniższej energii nie wykazuje oddziaływań w obszarze zatoki. W przypadku konformerów sennidyny C w zależności od rotacji wokół wiązania C-C można było odnotować obecność wiązań wodorowych OHO, w których protony z grup hydroksylowych skierowane są do tlenu karbonylowego w obszarze antronowym.

Sennidynę D reprezentuje pięć konformerów. Konformer o najniższej energii w konfiguracji gauche wykazuje oddziaływanie pomiędzy podstawnikiem w obszarze zatoki, a podstawnikiem z obszaru antronowego. Grupa metoksylova zwrócona z stronę tlenu karbonylowego tworzy dwa wiązania wodorowe OHO. Obecność wiązań wodorowych w obszarze antronowym

Doktorant potwierdził analizą QTAIM. Nadto, w niektórych strukturach Pan mgr Szymański odnotował wiązania prezentujące oddziaływania grup karboksylowych i metoksyłowych z obszaru zatoki z grupami znajdującymi się w obszarze antronowym. Zaobserwował również słabe oddziaływania pomiędzy atomami węgla w obrębie pierścieni, które są ułożone równolegle, co może sugerować oddziaływanie pomiędzy gęstością elektronową ugrupowań antronowych. W rezultacie analizy NCI Doktorant odnotował oddziaływania przyciągające, odpychające i dyspersyjne w cząsteczce sennidyny. Te ostatnie zlokalizowane są pomiędzy płaszczyznami pierścieni wchodzących w skład ugrupowania monoantronów. W oparciu o analizę ACID stwierdził, że gęstość elektronowa w cząsteczkach sennidyny A nie przenosi się pomiędzy ugrupowaniami monoantronów. Jest ona izolowana przez wiązanie C-C łączące oba monoantrony. To może tłumaczyć łatwy rozpad cząsteczek sennidyn do farmakologicznie czynnych cząsteczek monoantronów. Dodatkowo potwierdziła ten fakt analiza BDE, z której wynika, że wiązanie C-C pomiędzy cząsteczkami monoantronów ma niższą energię, niż w alkanach.

Ostatnią, analizowaną przez Doktoranta grupą związków pochodzenia naturalnego są fagopiryny. Strukturalnie są one podobne do sennidyny, jest w nich bowiem obszar antronowy, obszar zatoki, przy czym w strukturze fagopiryn pojawiają się pierścienie piperydyny i pirolidyny. Dla wszystkich omawianych fagopiryn Pan mgr Szymański przeprowadził analizy konformacyjne. Dla każdej z sześciu fagopiryn wykazał obecność sześciu konformerów. Dla każdego z nich wyznaczył wartości energii w kcal/mol i precyzyjnie przedstawił zależności strukturalne vs energia. W przypadku wszystkich konformerów fagopiryny A, Pan Mgr Szymański wykazał, że rozerwanie wiązania wodorowego OHN w obszarze zatoki na rzecz utworzenia wiązania wodorowego OHO z grupą karbonylową powoduje podwyższenie energii. Najstabilniejszym konformerem dla cząsteczki fagopiryny A wydaje się być ten z rozerwanym wiązaniem wodorowym OHO w obszarze antronowym.

Dla fagopiryny B, podobnie jak w przypadku fagopiryny A, najniższą energię posiada cząsteczka z dwoma wiązaniami wodorowymi OHO w obszarze antronowym i dwoma wiązaniami wodorowymi OHN zwróconymi w kierunku atomu azotu w pierścieniach piperydyny. Zatem, obecność wiązań wodorowych w cząsteczce fagopiryny B obniża jej energię. Podobnych obserwacji Doktorant dokonał w przypadku fagopiryny C oraz D. Najniższą energię posiadał konformer zawierający sześć wiązań wodorowych. Najniższą energię, w przypadku fagopiryny E, posiadał konformer z dwoma wiązaniami wodorowymi

OHN w obszarze zatoki z zachowaniem sprzężonego układu wiązań wodorowych OHO w obszarze antronowym.

Jak dla wszystkich wyżej omawianych fagopiryn, cząsteczka fagopiryny F ma najniższą energię w przypadku występowania sześciu wiązań wodorowych, w tym dwóch OHN zwróconych w stronę pierścieni piperodyny.

W cząsteczkach fagopiryn zmiana geometrii i oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych skutkuje zmianami w lokalizacji gęstości elektronowej. To z kolei powoduje zmiany aromatyczności pierścieni w układzie policyklicznym. W przypadku fagopiryny F utworzenie wiązań wodorowych OHN w obszarze zatoki wyraźnie zwiększa aromatyczność pierścieni A, D oraz F. Doktorant zauważył, że podobnie jak dla hiperycyny, najwyższe wartości HOMA mają pierścienie peryferyjne A, C, F oraz H. Z analizy NCI zauważyć można było dużą liczbę oddziaływań niekowalencyjnych w cząsteczce fagopiryny F. Podobnie jak dla hiperycyny, grupy metylowe w bliskim swoim sąsiedztwie generują oddziaływania dyspersyjne. Zwrócenie grup hydroksylowych w stronę atomu azotu w pierścieniu piperodyny skutkuje utworzeniem silnego wiązania wodorowego OHN, które może zastępować wiązanie wodorowe OHO w obszarze antronowym.

W oparciu o uzyskane przez Pana mgr Sebastiana Szymańskiego wyniki, kontent byłbym kilka wątków z Nim przedyskutować. Otóż:

1. Który z omawianych metabolitów/jego konformerów jest najtrwalszy i dlaczego?
2. Czy jest możliwość przeprowadzenia komputerowych symulacji modyfikacji chemicznych omawianych fitozwiązków? Jeśli tak, to na czym one ogólnie będą polegały i jakich ich aktywności się Pan spodziewa?
3. Być może w związku z ad. 2, jakie ma Pan dalsze plany w kontekście omawianych w rozprawie doktorskiej metabolitów lub innych związków?

Podsumowując moją recenzję pracy doktorskiej Pana mgr Sebastiana Szymańskiego, chciałbym podkreślić fakt, że Doktorant podjął się bardzo interesującej tematyki badawczej. W dobie niezwykle wysokich kosztów niezbędnych do poniesienia w celu przeprowadzenia ekstrakcji, izolacji, puryfikacji (technikami chromatograficznymi) naturalnych związków (w tym przypadku metabolitów z ugrupowaniem podwójnego antronu) z wysuszonej i odpowiednio zmikronizowanej

suchej masy surowca roślinnego, użyte przez Pana mgr Szymańskiego narzędzia komputerowe pozwoliły uzyskać nowe i interesujące dane na temat struktur przestrzennych, możliwych konformerów, ich energii, rodzaju/specyfiki oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych metabolitów z ugrupowaniem podwójnego antronu, tj. hiperycyny, sennidyn i fagopiryn. Uzyskane przez Doktoranta wyniki, moim zdaniem, otworzą drzwi do dalszych badań nad tymi cennymi związkami naturalnymi, być może obejmującymi projektowanie chemicznych modyfikacji tych cząsteczek w celu uzyskania nowych pochodnych charakteryzujących się np. wyższą trwałością, czy też nowymi interesującymi właściwościami biologicznymi. Takie symulacje mają szansę umożliwić szybką i wydajną syntezę nowych struktur oraz przebadanie ich aktywności na poziomie *in vivo*.

Uważam, że praca doktorska Pana mgr Sebastiana Szymańskiego spełnia wymagania stawiane kandydatom do stopnia doktora określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. poz. 742). Niniejszym, uważam za miły obowiązek uprzejmie poprosić Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr Sebastiana Szymańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

PROFESOR UCZELNI
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi


dr hab. n. farm. Łukasz Kuźma