



Katedra Inżynierii Biomedycznej

Prof. dr hab. Krystian Kubica

Wrocław, 17.07.2023 r.

Katedra Inżynierii Biomedycznej

Politechnika Wroclawska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Macieja Spiegla "Badania in silico aktywności antyoksydacyjnej związków fitochemicznych"

Rozprawę doktorską rozpoczyna omówienie w języku polskim o następującej strukturze:

Streszczenie po polsku i angielsku, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wprowadzenie, określenie założeń i celu pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski, omówienie poszczególnych publikacji, wydruki wskazanych wcześniej publikacji, uzupełnione w oświadczenia współautorów, dotyczące wkładu do wspólnych prac, wykaz pozostałych publikacji Doktoranta oraz inne osiągnięcia naukowo-badawcze.

Podstawowym elementem rozprawy są cztery opublikowane prace w czasopismach z Listy JCR:

[A]. Spiegel, M.*, Andruniów, T., & Sroka, Z. (2020). Flavones' and Flavonols' Antiradical Structure–Activity Relationship–A Quantum Chemical Study. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6), 461. <https://doi.org/10.3390/antiox9060461>
IF = 6.313, *MEiN* = 100

[B]. Spiegel, M., Kapusta, K.*, Kołodziejczyk, W., Saloni, J., Żbikowska, B., Hill, G. A., & Sroka, Z. (2020). Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids–Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(13), 3088. <https://doi.org/10.3390/molecules25133088>
IF = 4.412, *MEiN* = 140

[C]. Spiegel, M.*, & Sroka, Z. (2023). Quantum–mechanical characteristics of apigenin: Antiradical, metal chelation and inhibitory properties in physiologically relevant media. *Fitoterapia*, 164(October 2022), 105352. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105352>
IF = 3.204, *MEiN* = 100

[D]. Spiegel M.* (2022). Current Trends in Computational Quantum Chemistry Studies on Antioxidant Radical Scavenging Activity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 62(11), 2639–2658. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00104>
IF = 6.162, *MEiN* = 100

Wszystkie wymienione prace mają charakter teoretyczny i stanowią zwarty cykl monotematyczny, dotyczący zagadnienia oceny aktywności antyoksydacyjnych wybranych związków fitochemicznych.

W dalszej części recenzji będę się odwoływał do poszczególnych publikacji, podając przypisaną literę A..D.

K. Kubica



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Probleatów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynek D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Swoją ocenę rozpocznę od analizy publikacji oznaczonej jako [D].

Praca ta została opublikowana w znaczącym czasopiśmie naukowym o wyspecjalizowanym profilu badań z wykorzystaniem metod chemii obliczeniowej. Wartym podkreślenia jest to, że Doktorant jest pojedynczym autorem tej pracy. Publikacja ta ma charakter obszernej pracy przeglądowej odwołującej się do dużej liczby przywołanych prac (269 pozycji literaturowych). W pracy tej, Doktorant omówił techniki badań teoretycznych realizowanych na wielu platformach informatycznych: Multiwfn (analiza funkcji falowych i wizualizacja uzyskanych wyników), Eyring (program służący do wyznaczania wartości stałych kinetycznych procesów zachodzących w fazie gazowej jak i ciekłej), GROMACS (dynamika molekularna białek, lipidów, kwasów nukleinowych), Amber (badania symulacyjne techniką Dynamiki Molekularnej) oraz CHARMM (analiza układów wielocząsteczkowych). Wspomniane wyżej techniki badawcze zostały omówione w kontekście tematu rozprawy tj. oceny aktywności antyoksydacyjnej rodników.

Szczegółowa analiza opisanych narzędzi informatycznych, wykonana samodzielnie przez Doktoranta, stanowi bardzo dobry wstęp do jego rozprawy. Wartym podkreślenia jest uwaga Autora dotycząca konieczności pewnych reinterpretacji oraz rozszerzenia zakresu badań. Bogate studia literaturowe pozwoliły zauważyć, że większość prac dotyczących badań antyoksydantów koncentruje się na aktywnych formach tlenu, znacząco pomijając wkład grup chemicznych zawierających azot, węgiel i siarkę. Doktorant podkreśla także wagę oceny roli antyoksydantów na poziomie *in vivo*, wskazując na konieczność zwiększenia badań zmian metabolitów wynikłych z ich aktywności antyutleniających. Zdaniem Doktoranta, należy także badać możliwości zachodzenia reakcji prowadzących do efektu wzmocnienia zasięgu działania czynników utleniających, podlegających procesom ich „wygaszania”.

Omawiana publikacja została w zwięzły sposób omówiona na stronie 15, wystarczająco odzwierciedlając jej istotę.

Ocena pracy [A]

Przedmiotem tej pracy było zbadanie własności antyutleniających 7 związków z grupy flawonów oraz 6 flawanoli, będących ważnymi składnikami naszej diety, a których aktywność jest związana z ilością i położeniem grup hydroksylowych, stabilizacją struktury za pomocą wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych jak i tworzonych z otaczającymi cząsteczkami rozpuszczalnika, delokalizacją ładunku elektronów, czy też udziału podstawników, w tym grup metoksyłowych.

W pierwszym etapie badań, Doktorant wygenerował programem Avogadro zbiór izomerów flawonoidów, wykorzystywanych w dalszych badaniach teoretycznych. Następnie, otrzymane struktury były optymalizowane w „próżni”, w środowisku Gaussian. Uzyskane konformacje badanych związków były ponownie badane w otoczeniu uwzględniającym cząsteczki wody, w poszukiwaniu konformerów z najniższą energią. W tym miejscu chciałbym zapytać Doktoranta o możliwość wygenerowania w „próżni” nieistniejących struktur, wynikających z braku oddziaływania z otoczeniem.

W punkcie 2.2 opisano badane struktury przestrzenne wybranych flawonoidów, z których usunięto pojedyncze atomy wodoru z dostępnych grup hydroksylowych,



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynek D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434

K. Kubice



tworząc w ten sposób stany rodnikowe. W tabeli 2, zebrano wartości kątów dwuściennych, zapewne pomiędzy płaszczyznami pierścieni C i B, połączonych atomami C2-C1' oraz innych atomów pierścieni B i C. Ponieważ dane zawarte w tabeli 2 nie są dla mnie w pełni zrozumiałe, dlatego proszę Autora o wyjaśnienie znaczenia np. kąta 12.9° przypisanego atomowi C5 cząsteczki akacetyny.

W tabeli 4 zebrane są wartości potencjałów jonizacji oraz zmiany wartości entalpii towarzyszące dysocjacji protonów, w określonych pozycjach cząsteczek badanych flowonoidów. Jedynie dla luteoliny uzyskano ujemną wartość entalpii dysocjacji protonu z grupy OH, przyłączonej do atomu C4'. Jak można wytłumaczyć brak omówienia tej osobliwości w dyskusji wyników?

Na stronie 16 omawianej publikacji znajduje się opis wkładu poszczególnych współautorów, z którego wynika dominująca rola Doktoranta. Jednakże biorąc pod uwagę dołączone do rozprawy oświadczenia współautorów, można mieć pewne wątpliwości: Doktorant oświadcza, że jego udział polegał min. na rozwoju i zaprojektowaniu metodologii (badań), natomiast współautor, prof. dr hab. Tadeusz Andruniów, na pierwszym miejscu podaje opracowanie i zaprojektowanie metodologii badań. Warto aby Doktorant uszczegółowił swój wkład do tej pracy.

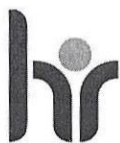
Ocena pracy [B]

Tematem tej pracy jest ocena aktywności antyoksydacyjnych oraz zdolności blokowania tworzenia rodników przez kwasy fenolowe, stanowiące także naturalny składnik owoców np. głogu, aronii czy czarnej porzeczki. W pracy tej, przedstawiono badania 22 rodzajów tych związków, różniących się ilością grup hydroksylowych i metylowych, w różnych konformacjach wzajemnych. Szczególną wartością tej pracy jest połączenie prac czysto doświadczalnych (spektrofotometryczne oznaczanie zdolności redukcji Fe^{3+}) z wynikami prac czysto teoretycznych. W opisie metody eksperymentalnej znajduje się równanie (2), w którym występuje współczynnik przyjmujący wartość 1,513 i którego wartość pozostaje domyślna.

Największą zdolność redukcji wykazał kwas 2,3 dihydrobenzoesowy, mający grupy hydroksylowe w pozycji wzajemnej orto, natomiast najmniejszą – kwas 3-hydroksybenzoesowy, mający pojedynczą grupę OH w pozycji 3. Wykazano także, że występowanie dwóch grup OH w wzajemnej pozycji meta, również wpływa na obniżenie aktywności redukcyjnej. Ponadto, wykazano niską aktywność redukcyjną pochodnych kwasów fenolowych, których cząsteczki posiadają dodatkowo grupy metylowe. W pracy tej zbadano także mechanizm stabilizacji badanych molekuł poprzez tworzenie wiązań wodorowych. Na tle uzyskanych wyników Doktorant stwierdza, że proponowane hipotezy zostały **potwierdzone** obliczeniami chemii kwantowej, co dla mnie jest stwierdzeniem dyskusyjnym.

Ocena pracy [C]

W publikacji [C], Doktorant podejmuje także problem zachwiania równowagi redukcyjno-oksydacyjnej od strony kontroli tworzenia wysoce reaktywnych związków, wskazując na znaczenie szeroko występujących w owocach, warzywach czy zielonej herbacie, polifenoli. Szczególną uwagę zwrócił na polifenol – apigeninę, występującą w wielu warzywach i owocach, która jest wchłaniana przez mikrobiom



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynek D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434

V. Kubisa



jelita cienkiego, skąd pośrednio jest transportowana do pozostałych tkanek organizmu. Pomimo wielu prac poświęconych badaniom apigeniny, istnieją jeszcze obszary wymagające poznania, takie jak hamowanie tworzenia rodnika ($\cdot\text{OOH}$) czy zdolność do chelatowania jonów Cu^{2+} czy Fe^{3+} , przez co zmniejsza się ich udział w wytwarzaniu wolnych rodników. Innym mechanizmem ochronnym, wykazany w tej pracy, jest inhibicja enzymu oksydazy ksantynowej, poprzez tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami apigeniny i aminokwasami centrum aktywnego tego enzymu (alaniny i waliny). Zmniejszona aktywność oksydazy ksantynowej pociąga także zmniejszoną ilość cząsteczek nadtlenu wodoru – jednego z aktywnych form tlenu.

Ocena merytoryczna:

Trafność podjętej tematyki badawczej i jej oryginalność

Szacuje się, że około 2% tlenu zawartego w powietrzu, którym oddychamy, jest prekursorem jednej z aktywnych form tlenu – anionorodnika ponadtlenkowego, powstałego w mitochondriach. Biorąc pod uwagę, że w ciągu doby zużywamy około 15 moli tlenu, to uwzględniając stałą Avogadra, każdej doby średnio pojawia się w naszych organizmach około 2×10^{23} wysoce reaktywnych form tlenu. Dzięki temu, że posiadamy naturalne mechanizmy likwidacji zagrożenia, poprzez specyficzne enzymy, takie jak dysmutazy i katalazy, enzymy „naprawiające” (np. reduktaza methemoglobinowa) oraz szereg rozwiązań nieenzymatycznych (glutation, witaminy C, E, karotenoidy, flawonoidy, bilirubina, kwas moczowy, melanina, albuminy, ferrytyna), nasze organizmy są w stanie utrzymywać równowagę procesów redukcji i utlenienia, bez szkody dla naszego zdrowia. Niestety, z biegiem lat, niektóre mechanizmy zaczynają zawodzić i wspomniana równowaga ulega zachwianiu, co często określa się ogólnym pojęciem stresu oksydacyjnego. Taka sytuacja stanowi zagrożenie dla zdrowia, o czym pisze we wstępie także Doktorant. Skutecznym sposobem przeciwdziałania tym niekorzystnym zmianom wydaje się wprowadzenie do organizmu, najprościej poprzez odpowiednią dietę, egzogennych substancji, których zadaniem jest wspomaganie organizmu w utrzymaniu wspomnianej równowagi. Ponieważ istnieje wiele związków chemicznych zawartych w pożywieniu, ważna jest ocena ich skuteczności antyoksydacyjnej. Można to zrobić poprzez badania chemiczne *in vitro* i/lub, jak wykazał Doktorant w swojej rozprawie, badaniami bazującymi na metodach chemii obliczeniowej.

Cennym i oryginalnym wkładem, recenzowanej rozprawy doktorskiej, w rozwój nauki jest szerokie podejście do oceny aktywności antyoksydacyjnej wybranych związków fitochemicznych, dostępnych w diecie człowieka, znanymi metodami chemii obliczeniowej. W tym miejscu należy podkreślić, że wyniki tych prac zostały opublikowane w czasopismach wysoko punktowanych przez MEiN (to, że ostatnio wydawnictwo MDPI - publikacja [A] oraz [B] nie ma dobrych opinii, nie dyskredytuje wysokiej jakości tej pracy).

Ponieważ od dobrych rozwiązań teoretycznych wymagamy możliwości predykcyjnych, które powinny być ewaluowane doświadczalnie, mam pytanie skierowane do Doktoranta: które z uzyskanych wyników badań teoretycznych można weryfikować doświadczalnie, bezpośrednio, pośrednio, a które uwzględniając obecny stan nauki, nie pozwalają na taką weryfikację?

K. Kubina



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynek D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 00001614

NIP: 896-000-58-51

Bank Zachodni WBK S.A.

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Analizując znaczenie fizjologiczne egzogennych antyoksydantów, chciałbym aby Doktorant omówił krótko sytuacje, w których ich zawartość w diecie może być niepożądana?

Nawiązując do opisu założeń i celu pracy (str. 8) chciałbym prosić aby Doktorant rozwinął myśl zawartą w zdaniu: „Podstawowym celem badań, na których bazuje cykl publikacji niniejszej pracy doktorskiej (brak przecinka) była ocena, za pomocą chemii obliczeniowej, aktywności antyoksydacyjnej wyselekcjonowanych związków fitochemicznych, jak i potwierdzenie założenie (zapewne założenia), że metody *in silico* stanowią aktualnie nieocenione narzędzie, jakie można stawiać na **równi z eksperymentami.**”

Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Wyniki prac teoretycznych Doktoranta, pozwalają stwierdzić, że metody obliczeniowe prowadzą do względnie szybkiej analizy własności antyoksydacyjnych dużej grupy związków wykazujących taki potencjał. Wstępnie, można wyselekcjonować te, które są najbardziej pożądane w diecie człowieka, oraz takie, które potocznie uważa się za prozdrowotne. Analiza aktywności różnych konformerów może być praktycznie wykorzystana w laboratoriach chemicznych w pracach nad chemicznymi modyfikacjami znanych już związków.

Teoretyczne prace badawcze powinny wyprzedzać wiedzę wynikającą z prac eksperymentalnych, zaś wnioski wynikające z tych prac powinny być weryfikowalne doświadczalnie. W tym miejscu chciałbym prosić Doktoranta o krótkie omówienie metod eksperymentalnego badania własności antyoksydacyjnych badanych przez niego związków fitochemicznych.

Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Nie mam uwag dotyczących poprawności językowej, w tym stylistycznej i interpunkcyjnej publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Jednakże, w opisowej części w języku polskim brakuje przecinków. Przykładem może być zdanie na stronie 6 zaczynające się słowami „Do innych...”. Autor używa także kolokwializmu „zmiatać wolne rodniki”, który nie mieści się w terminologii naukowej. Mam także wątpliwości czy, jak pisze Autor w punkcie 3.1, program PaDEL-Descriptor może być „spożytkowany na potrzeby obliczenia...”. Najpoważniejsze uwagi językowe dotyczą punktu 4. Wyniki, dyskusja i wnioski. W punkcie tym, Doktorant omawia publikacje stanowiące rozprawę doktorską. Błędy stylistyczne i gramatyczne nie ułatwiały mi analizy opublikowanych prac. (W mojej ocenie takie omówienie jest zbędne). Moje zastrzeżenia budzi np. fragment na stronie 13 zaczynający się słowem „Rzeczywiście”.

Ocena metodologiczna:

Dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

Bogate studia literaturowe wskazane w samej pracy przeglądowej [D] pozwalają mi stwierdzić, że Doktorant przeprowadził bardzo wnikliwą analizę tekstów źródłowych oraz umiejętnie wykorzystał je w swoich pracach twórczych.

K. Kuliaso



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynek D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 00001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Poprawność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania).

W oparciu o moją ocenę pracy [D], oraz prac [A], [B] i [C], jestem przekonany, że Doktorant bardzo dobrze opanował narzędzia informatyczne i umiejętnie, z sukcesem stosuje je w przedstawionych badaniach.

Poprawność układu pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska bazuje na 4 monotematycznych publikacjach, z których ostatnia stanowi przegląd metod badań komputerowych - może stanowić doskonały wstęp do całego cyklu. W moim odczuciu, ta praca powinna być umieszczona na pozycji pierwszej.

Wniosek końcowy (konkluzja)

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską magistra Macieja Spiegla oceniam bardzo wysoko, głównie ze względu na zastosowane zaawansowane narzędzia badawcze, wymagające znaczącego poszerzenia wiedzy z zakresu chemii obliczeniowej. W mojej ocenie, rozprawa ta wnosi znaczący wkład w poznanie molekularnych podstaw własności antyoksydacyjnych badanych związków fitochemicznych.

Praca ta niewątpliwie zasługuje na wyróżnienie i jestem skłonny o to wnioskować, po wysłuchaniu prezentacji podczas obrony.

Biorąc pod uwagę publikacje stanowiące rozprawę doktorską oraz bogaty, jak na doktoranta, pozostały dorobek naukowy (15 publikacji w bardzo dobrych, wysoko impaktowych czasopismach naukowych) mogę stwierdzić, iż mgr Maciej Spiegel jest bardzo dobrze przygotowanym naukowcem, zdolnym prowadzić samodzielne badania z wykorzystaniem metod obliczeniowych chemii.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr. Macieja Spiegla spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr. Macieja Spiegla do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Wrocław, dnia 17 lipca 2023

Krzysztof Kubica
prof. dr hab. Krystian Kubica



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wydział Podstawowych
Problemów Techniki

Katedra Inżynierii Biomedycznej
pl. Grunwaldzki 13
50-377 Wrocław
budynki D-1

T: +48 71 320 65 80
F: +48 71 327 77 27

www.ibp.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434