

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych w związku z
ubieganiem się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Tomasz Gubica

**Badania enzymatyczne i fizykochemiczne pochodnych sacharydów o
potencjale biologicznym**

Zakład Chemii Fizycznej
Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny



Warszawa 2018

1. Imię i Nazwisko

Tomasz Gubica

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

magister, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2002.

doktor nauk chemicznych, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2007.

„Studia nad strukturą i oddziaływaniem nitrofenylowych pochodnych sacharydów z cyklodekstrynami w wybranych procesach fizykochemicznych”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

10.2007 – 01.2010 Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
(specjalista naukowo-techniczny)

02.2010 – 09.2010 Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
(adiunkt)

10. 2010 – nadal Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
(adiunkt)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

„Badania enzymatyczne i fizykochemiczne pochodnych sacharydów o potencjale biologicznym”

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

H1. K. Paradowska, **T. Gubica**, A. Temeriusz*, M.K. Cyrański, I. Wawer. “¹³C CP MAS NMR and crystal structure of methyl glycopyranosides” *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 2299-2307. IF 1,960. MNiSzW 32.

- H2. **T. Gubica**, E. Winnicka, A. Temeriusz*, M. Kańska. "The influence of selected *O*-alkyl derivatives of cyclodextrins on the enzymatic decomposition of L-tryptophan by L-tryptophan indole-lyase" *Carbohydrate Research* **2009**, *344*, 304-310. IF 2,025. MNiSzW 32.
- H3. **T. Gubica**, A. Temeriusz*, K. Paradowska, A. Ostrowski, P. Klimentowska, M.K. Cyrański. "Single-crystal and powder X-ray diffraction and solid-state ¹³C NMR of *p*-nitrophenyl glycopyranosides, the derivatives of D-galactose, D-glucose, and D-mannose" *Carbohydrate Research* **2009**, *344*, 1734-1744. IF 2,025. MNiSzW 32.
- H4. **T. Gubica***, A. Pełka, K. Pałka, A. Temeriusz, M. Kańska. "The influence of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) on the enzymatic decomposition of L-phenylalanine catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase" *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 1855-1859. IF 2,332. MNiSzW 25.
- H5. **T. Gubica***, D.K. Stępień, A. Temeriusz, K. Paradowska, E. Głowacka, M.K. Cyrański, A. Ostrowski. "Solid-state structure of *N*-*o*-, *N*-*m*-, and *N*-*p*-nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-xylopyranosylamines" *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 2491-2498. IF 2,332. MNiSzW 25.
- H6. **T. Gubica***, D.K. Stępień, A. Ostrowski, D.M. Pisklak, A. Temeriusz, E. Głowacka, K. Paradowska, M.K. Cyrański. "Crystal and molecular structure of nitrophenyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-β-D-xylopyranosides" *Journal of Molecular Structure* **2012**, *1007*, 227-234. IF 1,404. MNiSzW 20.
- H7. **T. Gubica***, D.K. Stępień, D.M. Pisklak, A. Ostrowski, M.K. Cyrański. "Single-crystal and powder X-ray diffraction, ¹³C CP/MAS NMR, and DFT-GIAO calculations of methyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranoside and methyl 2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranosyl)-α-D-glucopyranoside" *Journal of Molecular Structure* **2013**, *1036*, 407-413. IF 1,599. MNiSzW 20.
- H8. **T. Gubica***, J. Bukowicki, D.K. Stępień, A. Ostrowski, D.M. Pisklak, M.K. Cyrański. "Solid-state structure of methyl 2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside and methyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside" *Journal of Molecular Structure* **2013**, *1037*, 49-56. IF 1,599. MNiSzW 20.
- H9. **T. Gubica***, Ł. Szeleszczuk, D.M. Pisklak, D.K. Stępień, M.K. Cyrański, M. Kańska. "Reliable evaluation of molecular structure of methyl 3-*O*-nitro-α-D-glucopyranoside and its intermediates by means of solid-state NMR spectroscopy and DFT optimization in the

- absence of appropriate crystallographic data” *Tetrahedron* **2014**, 70, 1910-1917. IF 2,641. MNiSzW 30.
- H10. J. Bukowicki, **T. Gubica***, Ł. Szeleszczuk. “Time-effective and reliable solid-state structure evaluation of selected peracetylated β -maltose derivatives by means of grid search, genetic algorithm and DFT calculations” *Tetrahedron* **2014**, 70, 4008-4016. IF 2,641. MNiSzW 30.
- H11. **T. Gubica***, K. Pałka, Ł. Szeleszczuk, M. Kańska. “Enhanced enzymatic activity of phenylalanine dehydrogenase caused by cyclodextrins” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, 118, 89-94. IF 2,189. MNiSzW 25.
- H12. Ł. Szeleszczuk, **T. Gubica***, A. Zimniak, D.M. Pisklak, K. Dąbrowska, M.K. Cyrański, M. Kańska. “The potential for the indirect crystal structure verification of methyl glycosides based on acetates’ parent structures: GIPAW and solid-state NMR approaches” *Chemical Physics Letters* **2017**, 686, 7-11. IF 1,815. MNiSzW 25.

Dane bibliometryczne publikacji habilitacyjnych:

Σ IF 24,562

Σ MNiSzW 316

pierwszy autor w 9 pracach

autor korespondencyjny w 9 pracach

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Najpopularniejszą obecnie postacią leków jest forma stała. Jednak substancje aktywne wykazują swoje działanie dopiero po rozpuszczeniu w płynach ustrojowych. Te dwa stany występowania substancji czynnych - ciało stałe i roztwór - żądają się odmiennymi prawami farmacji fizycznej. Substancje lecznicze, które w większości przypadków są związkami organicznymi o stałym stanie skupienia, mogą występować w różnych odmianach polimorficznych. Każdy polimorf charakteryzuje się odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, w tym rozpuszczalnością i trwałością. Biodostępność leku zależy przede wszystkim od rozpuszczalności zastosowanej odmiany polimorficznej. Dlatego też koncerny farmaceutyczne jak i ośrodki akademickie poświęcają wiele uwagi fizykochemii ciała stałego

substancji o działaniu biologicznym. Również badania nad roztworami związków chemicznych o potencjale farmakologicznym angażują badaczy z bardzo szerokiego spektrum.

W niniejszym cyklu publikacji habilitacyjnych przedstawiłem badania fizykochemiczne ciała stałego i roztworów obiecujących, pod względem działania biologicznego, pochodnych sacharydów. Do charakterystyki ciała stałego wykorzystywałem następujące metody badawcze: dyfrakcję rentgenowską proszków (PXRD) oraz monokryształów (SCXRD), spektroskopię NMR dla ciała stałego (ssNMR) oraz różne metody obliczeniowe (w tym algorytm genetyczny i periodyczne obliczenia DFT). Badania w roztworze z udziałem enzymów wykonywałem metodą spektrofotometryczną z uwzględnieniem modelowania molekularnego.

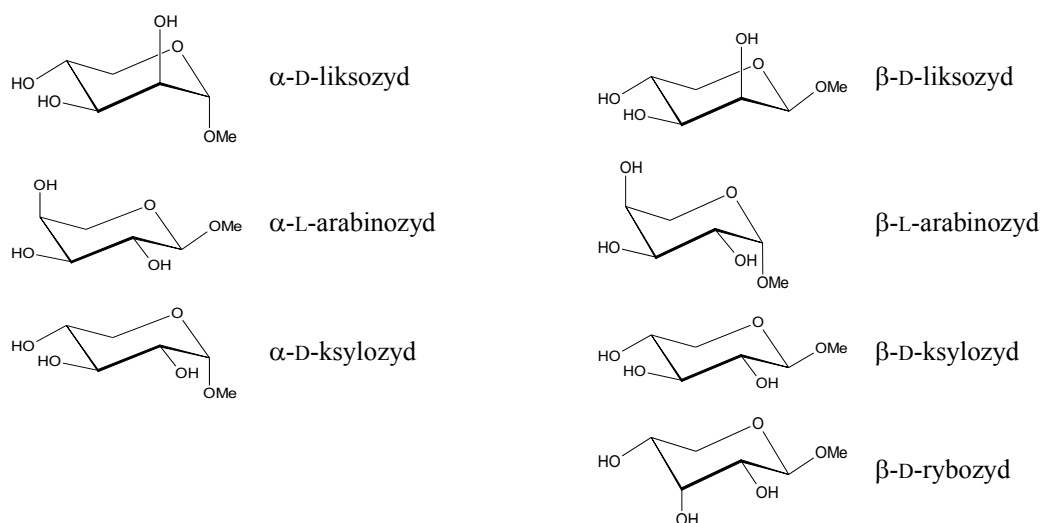
Wiodącym celem przeprowadzonych badań było wytypowanie cennych pod względem działania biologicznego pochodnych sacharydów oraz uzyskanie dla nich pełnej charakterystyki fizykochemicznej. Cele szczegółowe publikacji w cyklu habilitacyjnym to:

- wykazanie komplementarności metod eksperymentalnych (PXRD, SCXRD, ssNMR) oraz obliczeń teoretycznych (DFT, GIPAW, mechanika molekularna) w badaniach strukturalnych bioaktywnych sacharydów (publikacje H1, H3, H5-H10 i H12)
- określenie wpływu natywnych i eterowych pochodnych cyklodekstryn na procesy enzymatyczne z udziałem tryptofanu (publikacja H2) oraz fenyloalaniny (publikacje H4 i H11)
- synteza pochodnych sacharydów o spodziewanym działaniu biologicznym:
 - dwucukry połączone nietypowym wiązaniem glikozydowym (środki dietetyczne) (publikacje H7 i H8)
 - azotan(V) glukozy (substancja o potencjalnym działaniu w chorobach sercowo-naczyniowych) (publikacja H9)
 - ksylozyloaminy nitrofenylu (substancje o możliwym działaniu przeciwgrzybiczym) (publikacja H5)
 - ksylozydy nitrofenylu (pochodne środków przeciwzakrzepowych) (publikacja H6)
 - eterowe pochodne cyklodekstryn (substancje pomocnicze w preparatach zawierających tryptofan) (publikacja H2); (substancje protekcyjne dla liazы fenyloalaninowej stosowanej w fenyloketonurii) (publikacja H4).

Wyniki badań

H1. K. Paradowska, **T. Gubica**, A. Temeriusz*, M.K. Cyrański, I. Wawer. “ ^{13}C CP MAS NMR and crystal structure of methyl glycopyranosides” *Carbohydrate Research* **2008**, 343, 2299-2307.

Dla aldopentoz, monosacharydów zawierających grupę aldehydową i pięć atomów węgla w cząsteczce, możliwe jest występowanie czterech różnych konfiguracji absolutnych: *likso*, *rybo*, *arabino* i *ksylo*. Szczególnie ważną, pod względem biologicznym, aldopentozą jest ryboza, która stanowi nieodzowny element strukturalny kwasu rybonukleinowego (RNA). Olbrzymie biomolekuły, takie jak na przykład wspomniany RNA, są trudnymi obiektami do badań strukturalnych. Często stosowanym uproszczeniem w takich przypadkach jest analiza budowy mniejszych fragmentów naturalnych polimerów.^{1,2} Celem niniejszej pracy było uzupełnienie w literaturze danych strukturalnych dla wszystkich aldopentoz - „cegielek” budujących biopolimery. Ze względu na mutarotację - zjawisko zmiany konfiguracji na anomerycznym atomie węgla - wprowadziłem zabezpieczenie hemiacetalowej grupy hydroksylowej w każdej rozpatrywanej aldopentozie. Otrzymałem metylowe (czyli najprostsze) glikozydy, które najbardziej przypominały niesfunkcjonalizowane sacharydy i nie ulegały one już mutarotacji. W grupie tej znalazły się następujące substancje: α - i β -D-likso-, α - i β -L-arabino-, α - i β -D-ksylozydy oraz β -D-rybozyd metylu (Rys. 1).



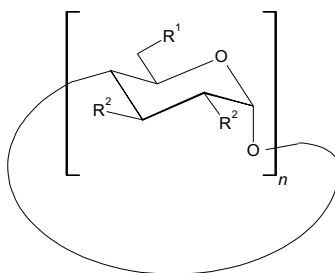
Rys. 1. Glikozydy metylu - pochodne aldopentoz.

Do analizy strukturalnej, w przypadku arabinozy, wybrałem szereg konfiguracyjny L, gdyż paradoksalnie D-arabinoza w przyrodzie występuje niezwykle rzadko. Przedmiotem badań strukturalnych w ciele stałym nie stał się α -D-rybozyd metylu, gdyż pomimo wielu prób krystalizacji nie uzyskałem formy krystalicznej. Jest to zgodne z literaturą,³ ponieważ substancję tę opisywano jako olej. Z puli zsyntetyzowanych przeze mnie glikozydów jedynie dla β -D-liksozydu metylu nie istniały dane z SCXRD. Chociaż dostępna była struktura krystalograficzna dla drugiego anomeru tego glikozydu,⁴ zdecydowałem się przedstawić również własne badania SCXRD ze względu na lepsze parametry udokładnienia aktualnej struktury. Dzięki uzyskanym danym poszerzyłem informacje o efekcie anomerycznym występującym w tym rzadkim cukrze. Zaobserwowałem charakterystyczne skrócenie wiązania O5–C1 oraz wydłużenie wiązania O1–C1 w anomerze alfa. Ponadto zauważyłem wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe O2–H...O5 w cząsteczce α -D-liksozydu metylu. Warto zaznaczyć, iż wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe są rzadko obserwowane w monocukrach. W pracy tej posłużyłem się również pomiarami ssNMR, które skomentowałem w oparciu o rezultaty uzyskane z PXRD. Dzięki połączeniu obu tych metod wykazałem, że makroskopowe próbki obu liksozydów, ksylozydów i α -L-arabinozyd metylu zawierają jeden polimorf oraz udowodniłem, iż wybrane monokryształy do analizy rentgenowskiej należą właśnie do badanych odmian polimorficznych. W widmie ^{13}C CP/MAS NMR dla β -L-arabinozydu metylu sygnały były podwojone, co mogło sugerować, iż albo obecny jest jeden nowy polimorf tego glikozydu o dwóch niezależnych cząsteczkach w komórce elementarnej kryształu ($Z' = 2$) albo istnieją dwa polimorfy mające po jednej niezależnej cząsteczce w części asymetrycznej sieci krystalicznej ($Z' = 1$). Porównanie eksperymentalnego dyfraktogramu proszku β -L-arabinozydu metylu z dwoma teoretycznymi obrazami dyfrakcyjnymi dla znanych odmian polimorficznych^{5,6} tej substancji doprowadziło mnie do wniosku, iż dysponuję mieszaniną tych faz krystalicznych nie zaś nowym polimorfem. W przypadku rybozydu, na widmie ^{13}C CP/MAS NMR niektóre sygnały były potrojone, co można było wytłumaczyć trzema możliwymi sytuacjami: (i) obecnością trzech polimorfów o $Z' = 1$ każdy; (ii) obecnością jednego polimorfu o $Z' = 3$; bądź (iii) występowaniem dwóch polimorfów o $Z' = 1$ i 2. W widmie proszkowym (PXRD) odnalazłem refleksy pochodzące od znanej formy krystalicznej tego rybozydu o $Z' = 1$.⁷ W związku z czym liczba możliwych interpretacji obserwowanego zjawiska zawężyła się do najbardziej prawdopodobnej sytuacji, tj. współistnienia formy krystalicznej o $Z' = 2$ wraz ze znanym polimorfem. Oprócz badań o charakterze czysto eksperymentalnym, wykonałem również serię obliczeń teoretycznych, dzięki którym potwierdziłem obecność

wiązań wodorowych tożsamy z danymi dyfrakcyjnymi. Obliczenia te dotyczyły wpływu wiązań wodorowych z zewnętrzną molekułą wody na stałe ekranowania atomów węgla.

- H2. **T. Gubica**, E. Winnicka, A. Temeriusz*, M. Kańska. “The influence of selected *O*-alkyl derivatives of cyclodextrins on the enzymatic decomposition of L-tryptophan by L-tryptophan indole-lyase” *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 304-310.

W pracy tej opisałem syntezę siedmiu nowych eterowych pochodnych cyklodekstryn oraz wyjaśniłem mechanizm oddziaływania otrzymanych przeze mnie cyklodekstryn (oraz dwóch handlowych tego typu pochodnych) na enzymatyczny rozkład tryptofanu. Badany enzym, tryptofanaza, należący do grupy liaz rozkłada tryptofan na indol, kwas pirogronowy i amoniak. Aminokwas, który był przedmiotem eksperymentów, pełni istotną rolę w biosyntezie serotoniny - ważnego neuroprzekaźnika. Tryptofan jest zarejestrowanym suplementem diety w Stanach Zjednoczonych i w Europie, który stosuje się pomocniczo w depresji. Moja praca miała na celu znalezienie odpowiednich substancji kompleksujących tryptofan po to, aby wydłużyć jego biodostępność, np. po podaniu w odpowiednim suplemencie diety. Pochodne eterowe cyklodekstryn, które były dodawane do badanego procesu enzymatycznego, przedstawiłem na Rys. 2.



<i>n</i>	R ¹	R ²
6	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	O(CH ₂) ₂ OCH ₃
6	CH ₂ OH	OCH ₃
6	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	OCH ₃
6	CH ₂ OH	O(CH ₂) ₂ OCH ₃
6	CH ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₃	OCH ₂ CH(OH)CH ₃
7	CH ₂ OH	OCH ₃
7	CH ₂ O(CH ₂) ₂ OCH ₃	OCH ₃
7	CH ₂ OH	O(CH ₂) ₂ OCH ₃
7	CH ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₃	OCH ₂ CH(OH)CH ₃

Rys. 2. Eterowe pochodne cyklodekstryn.

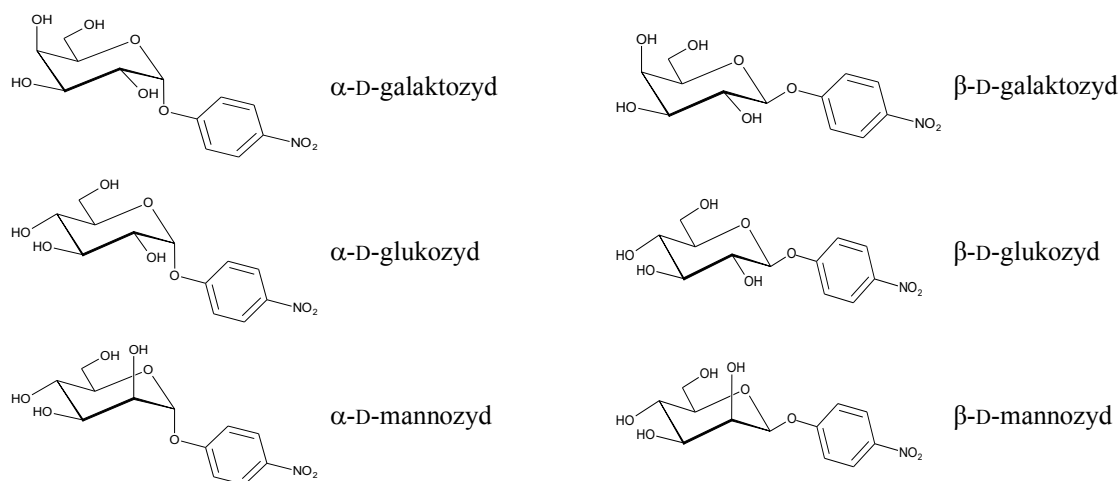
Wybór takich pochodnych miał na celu poszerzenie informacji uzyskanych z poprzednich moich badań.⁸ Upřednio określiłem wpływ natywnych i permetylowanych α- i β-cyko-

dekstryn na tę samą biotransformację. Zarówno wcześniej, jak i w tej pracy, zauważyłem, że każda cyklodekstryna wywoływała mieszaną (kompetycyjną i niekompetycyjną) inhibicję tryptofanazy. W poprzedniej pracy doszedłem do wniosku, iż o inhibicji kompetycyjnej przede wszystkim decyduje geometria kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn z tryptofanem. Z kolei stałe trwałości tych kompleksów wydają się mieć dużo mniejsze znaczenie. W tej pracy pogłębiłem dyskusję dotyczącą wpływu struktury przestrzennej kompleksów cyklodekstryn na enzymatyczny rozkład tryptofanu. Ułożenie tryptofanu we wnęce cyklodekstryn uzależnione było od rodzaju i umiejscowienia podstawników *O*-alkilowych w cząsteczce kompleksującej. Podstawniki metylowe znajdujące się przy pierwszorzędowych grupach hydroksylowych powodują zamknięcie węższej krawędzi cyklodekstryny i cząsteczka przypomina wtedy miskę.⁹ Z punktu widzenia reaktywności kompleksów inkluzyjnych tryptofanu istotne jest tworzenie wiązań wodorowych między wolnymi grupami hydroksylowymi obecnymi w cyklodekstrynie lub w podstawnikach hydroksypropylowych. Zaobserwowana inhibicja niekompetycyjna wydaje się być związana również z kompleksowaniem, lecz tym razem samego enzymu. Zewnętrzne ugrupowania aromatyczne w łańcuchu polipeptydowym tryptofanazy mogły tworzyć kompleksy inkluzyjne z cyklodekstrynami zmieniając w ten sposób konformację enzymu. Powszechnie stosowane w farmacji hydroksypropylowe pochodne α - i β -cyklodekstryny, w tych badaniach, okazały się być najsilniejszymi inhibitorami kompetycyjnymi tryptofanazy, dlatego też warto rozważyć użycie tych cyklodekstryn jako substancji protekcyjnych w preparatach zawierających tryptofan.

H3. **T. Gubica**, A. Temeriusz*, K. Paradowska, A. Ostrowski, P. Klimientowska, M.K. Cyrański. "Single-crystal and powder X-ray diffraction and solid-state ^{13}C NMR of *p*-nitrophenyl glycopyranosides, the derivatives of D-galactose, D-glucose, and D-mannose" *Carbohydrate Research* **2009**, 344, 1734-1744.

Obiektem badań strukturalnych w omawianej pracy było sześć glikozydów *p*-nitrofenylu. Wybrałem pochodne takich monocukrów, które są najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie, tj. glukozy, galaktozy i mannozy (Rys. 3).

Glikozydy *p*-nitrofenylu są powszechnie stosowane do badań aktywności enzymatycznej glikozydaz. Enzymy te katalizują hydrolizę wiązań glikozydowych. Glikozydy *p*-nitrofenylu są bezbarwne, natomiast wolny *p*-nitrofenol, powstały w wyniku działania glikozydazy, ma intensywną barwę. Dlatego też procesy enzymatyczne z udziałem omawianych glikozydów



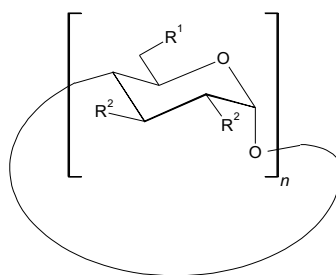
Rys. 3. Glikozydy *p*-nitrofenylu.

mogą być monitorowane spektrofotometrycznie. Celem tej pracy było usystematyzowanie informacji strukturalnych o tej ważnej grupie związków organicznych. W literaturze niedostępne były struktury krystalograficzne dla obu anomerów galaktozydów. W pracy tej uzupełniłem brakujące dane. Na podstawie uzyskanych wartości długości wiązań atomowych potwierdziłem występowanie efektu anomerycznego w obu pochodnych galaktozy. W pracy tej pokazałem jak cenne w analizie strukturalnej substancji biologicznie czynnych jest stosowanie wielu metod eksperymentalnych, takich jak SCXRD, PXRD i ssNMR. Na przykład, dla β -D-galaktozydu *p*-nitrofenylu stwierdziłem za pomocą PXRD obecność dwóch form polimorficznych. Ograniczenie badań tylko do SCXRD i ssNMR nie doprowadziłoby do tego wniosku. Z kolei pomiar ^{13}C CP/MAS NMR w łatwy sposób potwierdził, iż β -D-glukozyd *p*-nitrofenylu jest solwatem etanolu. Ponadto szybki pomiar PXRD wskazał na rodzaj polimorfu α -D-mannozydu *p*-nitrofenylu, z którym pracowałem. W literaturze dostępne są bowiem dwie struktury krystalograficzne dla tego glikozydu, tj. struktura półwodzianu¹⁰ i etanolanu.¹¹

H4. **T. Gubica***, A. Pełka, K. Pałka, A. Temeriusz, M. Kańska. “The influence of cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins) on the enzymatic decomposition of L-phenylalanine catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase” *Carbohydrate Research* **2011**, 346, 1855-1859.

Źródłem inspiracji do przeprowadzenia badań opisanych w tej pracy było doniesienie w literaturze o obiecującym postępowaniu w chorobie genetycznej - fenyloketonurii.¹² U osób

chorych na fenyloketonurię aminokwas fenyloalanina jest inaczej metabolizowany prowadząc do gromadzenia się szkodliwych substancji w organizmie. Choroba ta jest nieuleczalna i jedyną dostępną formą radzenia sobie z tą dolegliwością jest dieta uboga w fenyloalaninę. Jednak fenyloalanina, jako podstawowy aminokwas, występuje nieodzownie w każdym białku. Istnieją doniesienia w literaturze o możliwości podawania mikrokapsułowanego enzymu - liazy fenyloalaninowej wraz z pokarmem.¹²⁻¹⁴ Odpowiednio spreparowana liaza fenyloalaninowa wolniej ulega wtedy rozpadowi w przewodzie pokarmowym i ma szansę rozłożyć obecną w pożywieniu fenyloalaninę na kwas cynamonowy. Kwas ten jest o wiele mniej szkodliwy niż kwas fenylopirogronowy, który powstaje u osób chorych na fenyloketonurię. Spośród przebadanych substancji, cyklodekstryny najskuteczniej przeciwdziałały hydrolizie liazy fenyloalaninowej w układzie pokarmowym. W omawianej pracy oszacowałem wpływ natywnych i eterowych pochodnych α - i β -cyklodekstryn (Rys. 4) na aktywność katalityczną liazy fenyloalaninowej.



n	R^1	R^2
6	CH ₂ OH	OH
6	CH ₂ OH	OCH ₃
6	CH ₂ OCH ₃	OCH ₃
7	CH ₂ OH	OH
7	CH ₂ OH	OCH ₃
7	CH ₂ OCH ₃	OCH ₃

Rys. 4. Natywne i eterowe pochodne cyklodekstryn.

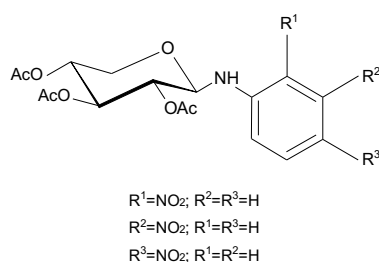
Otrzymałem dosyć nietypowe wyniki, gdyż wykorzystane przeze mnie cyklodekstryny, w zależności od konkretnej pochodnej, były albo inhibitorami albo aktywatorami badanego procesu enzymatycznego. Mając na względzie, iż cyklodekstryny posiadają właściwości kompleksujące białko enzymu, molekuły fenyloalaniny oraz produktu reakcji enzymatycznej - kwasu cynamonowego, to przeprowadzony eksperyment był dość złożony. Stąd też jego nietypowy rezultat. Fenyloalanina, przed dodaniem enzymu, była preinkubowana z odpowiednimi pochodnymi cyklodekstryn. W tym czasie tworzyły się kompleksy substratu reakcji enzymatycznej. Nieskompleksowane molekuły cyklodekstryn mogły później oddzia-

ływać z dodanym enzymem i produktem biokatalizy - kwasem cynamonowym. Kwas ten jest autoinhibitorem tego procesu. Im wyższe było stężenie dodanych cyklodekstryn, tym więcej cząsteczek gospodarza było dostępnych do kompleksowania kwasu cynamonowego i cząsteczek enzymu.

Zgodnie z uzyskanymi wynikami, większość użytych przeze mnie pochodnych cyklodekstryn zachowywało się jak inhibitory kompetycyjne i niekompetycyjne. Jedynie dla natywnej β -cyklodekstryny i heksakis(2,3-di-*O*-metylo)cyklomaltoheksaozy (i to dla niektórych ich stężeń) obserwowałem aktywację enzymu. W związku z czym tylko te pochodne mogą być rozpatrywane jako substancje protekcyjne dla liazy fenyloalaninowej.

H5. **T. Gubica***, D.K. Stępień, A. Temeriusz, K. Paradowska, E. Głowacka, M.K. Cyrański, A. Ostrowski. "Solid-state structure of *N*-*o*-, *N*-*m*-, and *N*-*p*-nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xylopyranosylamines" *Carbohydrate Research* **2011**, 346, 2491-2498.

Pochodne *N*-fenylo- β -D-ksylozyloaminy są inhibitorami enzymów i posiadają właściwości przeciwgrzybicze.¹⁵ Celem tej pracy było otrzymanie nieznanych pochodnych tej klasy związków organicznych oraz określenie ich pełnej charakterystyki strukturalnej. Obiektem badań były trzy izomery: *orto*, *meta* i *para* *N*-nitrofenylo- β -D-ksylozyloaminy ze wszystkimi zacetylowanymi grupami hydroksylowymi (Rys. 5).



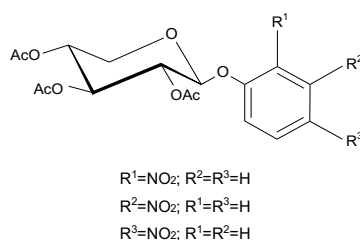
Rys. 5. *N*-nitrofenylo- β -D-ksylozyloaminy.

Najciekawsze rezultaty otrzymałem dla izomeru *orto*. Otóż odkryłem dla niego dwa przejścia polimorficzne podczas zmiany temperatury (przy ok. 180 i 210K). Rozwiązane zostały dwie struktury z pomiarów SCXRD w temperaturze 100 i 295K. W niższej temperaturze izomer *orto* miał cztery niezależne cząsteczki w komórce elementarnej kryształu ($Z' = 4$), zaś w wyższej temperaturze jedną niezależną cząsteczkę w części asymetrycznej kryształu ($Z' = 1$). Polimorf, który występował w zakresie temperatur 180-210K, posiadał z kolei trzy niezależne cząsteczki w swojej strukturze krystalicznej ($Z' = 3$). Oprócz pomiarów

SCXRD zarejestrowałem również widma ^{13}C CP/MAS NMR oraz dyfraktogramy proszków. Uzyskane rezultaty ze wszystkich pomiarów fizykochemicznych były spójne. Badane związki były jednorodnymi fazami krystalicznymi i dla jednego z nich wykryłem przejścia polimorficzne wywołane zmianą temperatury.

H6. **T. Gubica***, D.K. Stępień, A. Ostrowski, D.M. Pisklak, A. Temeriusz, E. Głowacka, K. Paradowska, M.K. Cyrański. “Crystal and molecular structure of nitrophenyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xylopyranosides” *Journal of Molecular Structure* **2012**, 1007, 227-234.

Obiektem badań strukturalnych w tej pracy były tlenowe analogii pochodnych ksylozy opisanych w poprzednim artykule (H5). Ksylozydy nitrofenylu, dla których wyznaczyłem strukturę cząsteczki i kryształu, są cennymi związkami w enzymologii podobnie do glikozydów opisanych w artykule H3 (Rys. 6).



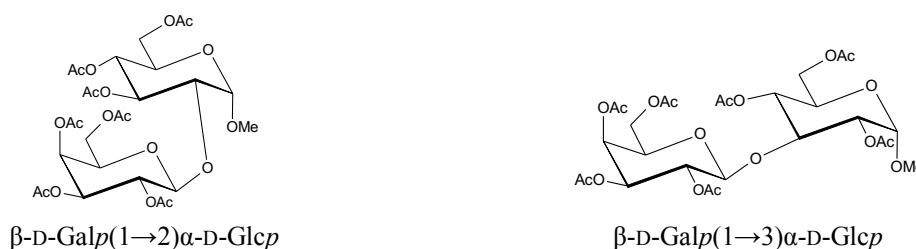
Rys. 6. Ksylozydy nitrofenylu.

Ponadto dla β -D-ksylozydów są dostępne badania,¹⁶⁻¹⁹ według których związki te mogą być środkami przeciwzakrzepowymi. Do charakterystyki strukturalnej ksylozydów nitrofenylu wykorzystałem szeroki wachlarz dostępnych metod pomiarowych. Mając na względzie, iż azotowe analogii badanych związków organicznych wykazywały przejścia polimorficzne wraz ze zmianą temperatury (publikacja H5), to w tej pracy włączyłem do technik pomiarowych również skaningową kalorymetrię różnicową (DSC). I rzeczywiście dla izomeru *meta* zaobserwowałem jedno przejście fazowe w temperaturze 126,5K. Dla obu polimorfów wykonałem pomiar SCXRD. Pomiary tego typu przeprowadziłem również dla pozostałych dwóch rozpatrywanych związków organicznych. Charakterystykę omawianych ksylozydów poszerzyłem o wymagający eksperyment ^{15}N CP/MAS NMR. Zauważyłem korelację pomiędzy kątem skręcenia płaszczyzny wyznaczonej przez grupę nitrową i pierścień benzenowy a teoretycznymi stałymi ekranowania dla jąder atomu ^{15}N w grupie nitrowej. Im mocniej ta grupa była skręcona względem pierścienia benzenowego, tym obliczone wartości stałych

ekranowania były większe. Jednak nie znalazłem takiej zależności między przesunięciami chemicznymi w widmach ^{15}N CP/MAS NMR a omawianym kątem dwuściennym. Brak spójności między danymi eksperymentalnymi i teoretycznymi, może wynikać z tego, iż obliczenia prowadziłem dla molekuł w próżni. Najwyraźniej zatem, otoczenie w kryształach ma przeważający wpływ na wartości rzeczywiste niż samo odchylenie grupy nitrowej.

H7. **T. Gubica***, D.K. Stępień, D.M. Pisklak, A. Ostrowski, M.K. Cyrański. “Single-crystal and powder X-ray diffraction, ^{13}C CP/MAS NMR, and DFT-GIAO calculations of methyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranoside and methyl 2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)- α -D-glucopyranoside” *Journal of Molecular Structure* **2013**, 1036, 407-413.

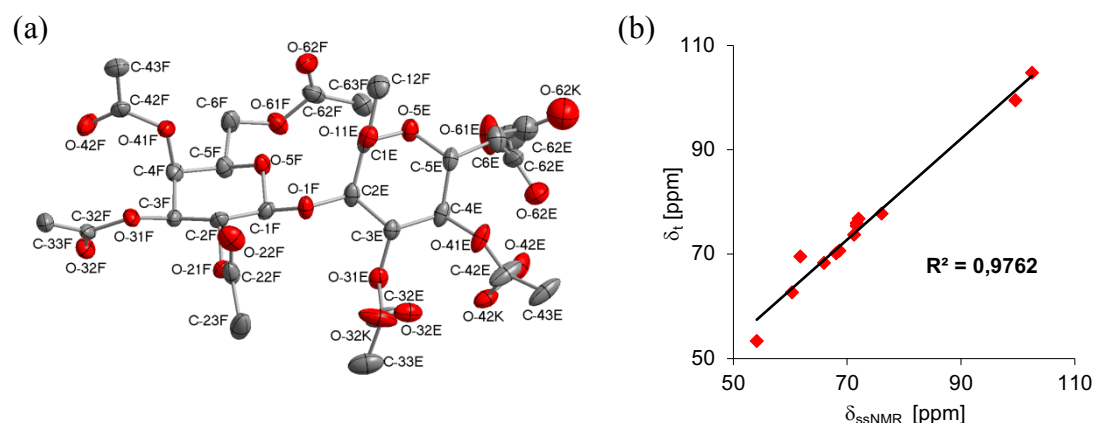
Izomaltuloza (zwana inaczej palatynozą) jest izomerem sacharozy, w którym glukoza i fruktoza połączone są nietypowym wiązaniem glikozydowym $\alpha(1\rightarrow6)$. Dzięki atypowemu połączeniu dwóch jednostek monosacharydowych w palatynozie, dwucukier ten jest wolniej hydrolizowany w organizmie człowieka.^{20,21} Zatem dostarczanie glukozy po spożyciu palatynozy jest rozłożone w czasie. Brak toksyczności i korzystny indeks glikemiczny palatynozy sprawił, iż stała się ona dodatkiem do napojów dla sportowców. Ciekawe właściwości palatynozy zachęciły mnie do poszukiwania innych dwucukrów zawierających glukozę oraz połączonych atypowym wiązaniem glikozydowym. Obiektem badań w prezentowanej publikacji były dwucukry zbudowane z glukozy i galaktozy, które połączone są wiązaniami glikozydowymi $\beta(1\rightarrow2)$ i $\beta(1\rightarrow3)$ (odpowiednio β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Glcp i β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 3) α -D-Glcp) (Rys. 7).



Rys. 7. Galaktozydoglukozydy.

W przypadku β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Glcp udało się rozwiązać strukturę cząsteczki z pomiarów SCXRD. Natomiast dla β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 3) α -D-Glcp mogłem oszacować jedynie parametry komórki elementarnej i określić liczbę niezależnych cząsteczek w asymetrycznej części

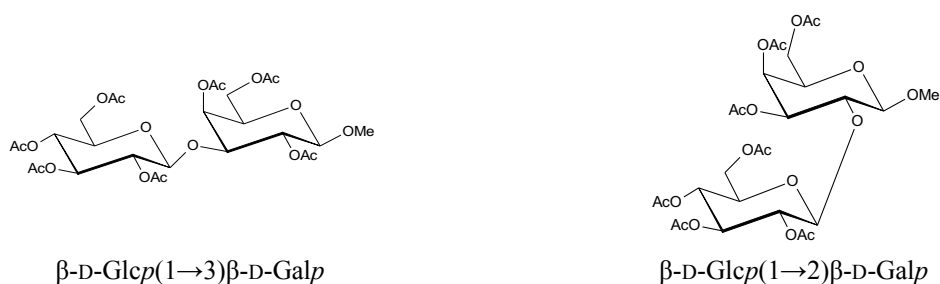
kryształu ($Z' = 2$). Dla β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Glcp Z' wynosiło 3. Na podstawie zarejestrowanych dyfraktogramów proszkowych doszedłem do wniosku, iż substancja ta zawiera dwa lub trzy polimorfy oraz parametry komórek elementarnych kryształów tych różnych faz są podobne. Dodatkową informację o próbce β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 3) α -D-Glcp uzyskałem z ssNMR. Otóż liczba sygnałów w widmie ^{13}C CP/MAS NMR przekroczyła liczbę atomów węgla w molekuale oraz sygnały charakteryzowały się różną intensywnością. Zatem można przypuszczać, iż zawartość poszczególnych faz krystalicznych była różna. Komplementarność SCXRD i ssNMR została wykazana w tej pracy na przykładzie nieuporządkowania przy atomie węgla C6 w jednej niezależnej cząsteczce w kryształ β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Glcp. To co od razu można zauważyć w strukturze cząsteczki w prezentacji typu ORTEP (Rys. 8a) ujawniło się jako zaburzenie liniowości zależności teoretycznych i eksperymentalnych przesunięć chemicznych (Rys. 8b).



Rys. 8. Nieuporządkowanie przy atomie C6 w kryształ β -D-Galp(1 $\rightarrow$ 2) α -D-Glcp. (a) ORTEP; (b) korelacja teoretycznych (δ_t) i eksperymentalnych (δ_{ssNMR}) przesunięć chemicznych.

- H8. **T. Gubica***, J. Bukowicki, D.K. Stępień, A. Ostrowski, D.M. Pisklak, M.K. Cyrański. “Solid-state structure of methyl 2,4,6-tri-*O*-acetyl-3-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside and methyl 3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-*O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)- β -D-galactopyranoside” *Journal of Molecular Structure* **2013**, 1037, 49-56.

W poszukiwaniu nowych sacharydów o podobnych właściwościach biologicznych do wspomnianej izomaltulozy, zająłem się charakterystyką ciała stałego dwóch dwucukrów, w których kolejność jednostek monosacharydowych była odwrócona w porównaniu do poprzedniej pracy (publikacja H7). Wzory strukturalne badanych substancji (wraz ze stosowanymi skrótami) przedstawiłem na Rys. 9.



Rys. 9. Glukozylogalaktozydy.

SCXRD i ssNMR zgodnie potwierdziły obecność jednej niezależnej cząsteczki w komórce elementarnej kryształu $\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow3)\beta\text{-D-Galp}$. Ponadto eksperyment ^{13}C CP/MAS NMR wskazał, że dwucukier ten składa się z jednej fazy krystalicznej (jeden polimorf). Bardziej czułe pomiary PXRD doprowadziły mnie do wniosku, że próbka $\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow3)\beta\text{-D-Galp}$ nie jest idealnie jednorodna i może zawierać niewielkie ilości (rzędu 1-2%) innego polimorfu bądź też zanieczyszczenia. Z kolei dla $\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow2)\beta\text{-D-Galp}$ niemożliwe było przeprowadzenie pomiarów SCXRD, gdyż substancja ta była amorficzna, co znalazło swoje potwierdzenie w pomiarach PXRD i ^{13}C CP/MAS NMR.

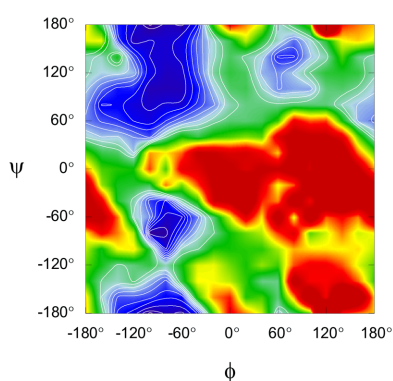
Wiodącym celem tej pracy była próba znalezienia odpowiedzi na pytanie: dlaczego jedna z badanych substancji występuje w postaci jednego polimorfu o $Z' = 1$, druga zaś jest amorficzna pomimo dużego podobieństwa w budowie chemicznej. Różnica pomiędzy cząsteczkami obu badanych dwucukrów sprowadzała się do odmiennego połączenia dwóch jednostek monosacharydowych. Połączenie to, a dokładniej kąty torsyjne wyznaczone przez wiązanie glikozydowe, decyduje o wzajemnym ułożeniu dwóch podjednostek cukrowych. Kąty te, ze względu na swoje istotne znaczenie, posiadają własne oznaczenia ϕ i ψ . Są one odpowiednio zdefiniowane jako $\text{O}5'\text{--C}1'\text{--O}1'\text{--C}3(2)$ oraz $\text{C}1'\text{--O}1'\text{--C}3(2)\text{--C}4(3)$.

Przy założeniu, iż o właściwościach ciała stałego decyduje budowa chemiczna na poziomie cząsteczki, w rozpatrywanym przypadku należałoby się skupić przede wszystkim na wartościach kątów ϕ i ψ w celu odpowiedzi na postawione pytanie. W analizie konformacyjnej dwucukrów wykorzystuje się na ogół metodę 'grid search', w której wyznacza się energię potencjalną konformerów uzyskanych dla wszystkich możliwych kątów torsyjnych wokół wiązania glikozydowego.²²⁻²⁵ Otrzymane wyniki prezentuje się później w postaci tzw. map adiabatycznych, które przedstawiają zależność energii potencjalnej od kątów ϕ i ψ . Największe trudności w tego typu analizie związane są z wyznaczeniem ułożenia podstawników egzocyklicznych na każdym etapie sporządzania mapy adiabatycznej.²⁶ Nowość tej pracy polegała na tym, iż po raz pierwszy wykorzystałem algorytm genetyczny w analizie

konformacyjnej typu 'grid search' sfunkcjonalizowanych dwucukrów. Zabieg ten pozwolił znacząco skrócić czas obliczeń.

Algorytm genetyczny jest metodą obliczeniową, która naśladuje mechanizmy ewolucji i genetyki.²⁷ „Osobnikami” w tej metodzie są poszczególne konformery, które ewoluują w kierunku najbardziej korzystnych energetycznie reprezentantów. Natomiast odpowiednikiem genomu tych „osobników” jest zbiór kątów torsyjnych dla podstawników egzocyklicznych.

Na mapie adiabatycznej sporządzonej dla β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp znajduje się jedno głębokie minimum energetyczne oraz trzy lokalna minima (Rys. 10).

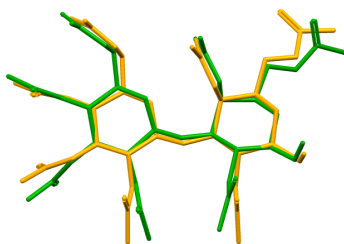


Rys. 10. Mapa adiabatyczna dla β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp.

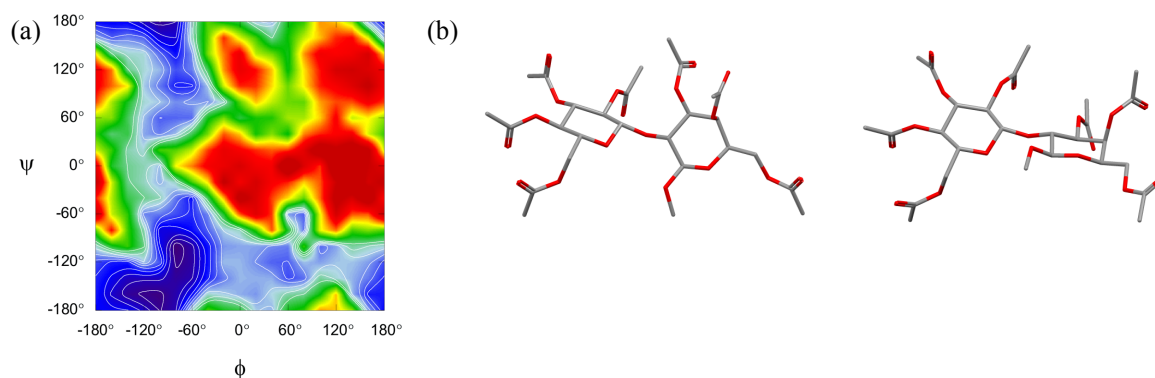
Konformacja odpowiadająca globalnemu minimum nie była jednak zgodna ze strukturą cząsteczki wyznaczoną za pomocą SCXRD. Brak zgodności można wytłumaczyć tym, iż obliczenia prowadzone były dla izolowanej cząsteczki w próżni, podczas gdy pomiar SCXRD uwzględnia oddziaływania międzycząsteczkowe. Niemniej jednak konformacja, która odpowiadała innemu minimum energetycznemu na mapie adiabatycznej dobrze odwzorowywała strukturę cząsteczki znalezioną przez SCXRD (Rys. 11).

Na mapie adiabatycznej β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Galp widoczne są cztery minima energetyczne, z których dwa mają zbliżone energie a różne wartości kątów ϕ i ψ (Rys. 12).

Skoro β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Galp posiada dwie znacząco różne konformacje o podobnych energiach, to być może dlatego nie może utworzyć się faza krystaliczna zawierająca jeden wybrany konformer ponieważ każdy z nich jest podobnie uprzywilejowany energetycznie.



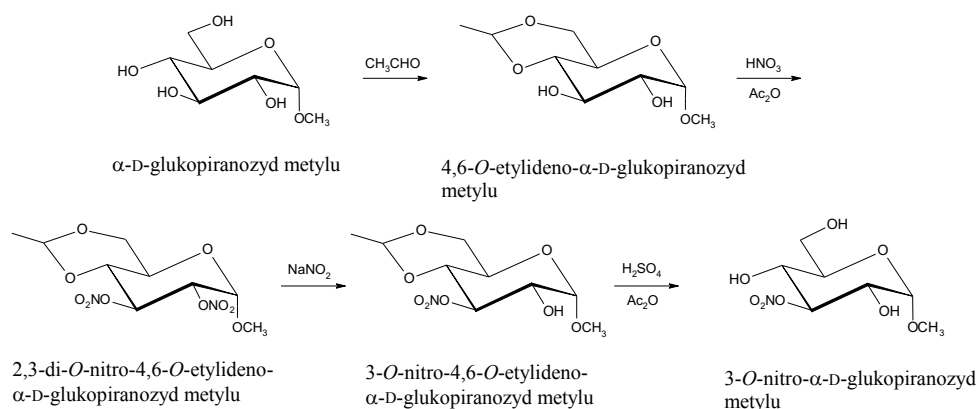
Rys. 11. Konformacje β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 3) β -D-Galp: obliczona (zielona) i eksperymentalna (żółta).



Rys. 12. Analiza konformacyjna β -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 2) β -D-Galp: (a) mapa adyabatyczna; (b) najkorzystniejsze energetycznie konformacje.

H9. **T. Gubica***, Ł. Szeleszczuk, D.M. Pisklak, D.K. Stępień, M.K. Cyrański, M. Kańska.
 “Reliable evaluation of molecular structure of methyl 3-*O*-nitro- α -D-glucopyranoside and its intermediates by means of solid-state NMR spectroscopy and DFT optimization in the absence of appropriate crystallographic data” *Tetrahedron* **2014**, 70, 1910-1917.

Azotany organiczne (nitraty) są cenionymi lekami stosowanymi w chorobach sercowo-naczyniowych. Ich działanie farmakologiczne związane jest z uwalnianiem tlenku azotu (NO), który jest aktywatorem cykazy guanylowej.^{28,29} Azotany organiczne stosuje się doraźnie bądź też przewlekle.³⁰ W przypadku przewlekłego przyjmowania nitratów dochodzi do rozwoju tolerancji i konieczne okazuje się zwiększanie dawki.³¹ Wraz ze zwiększeniem dawek zwiększa się częstość i intensywność skutków ubocznych.³² Wtedy konieczna jest zmiana danego azotanu na inny.^{33,34} Stąd też wynika nieustanna potrzeba wprowadzania do lecznictwa nowych azotanów organicznych. W omawianej pracy opisałem syntezę nowego azotanu(V) glukozy (Rys. 13), który wart jest zainteresowania ze strony farmakologów.



Rys. 13. Synteza azotanu(V) glukozy.

Azotany organiczne są prolekami, które przekształcane są przez enzymy w czynnik aktywny NO i inne nieaktywne metabolity.³⁵ W przypadku najbardziej znanego azotanu organicznego - triazotanu(V) glicerolu, reszta organiczna pozostała po uwolnieniu NO nie jest toksyczna.³⁶ Podobnie w przypadku nowo otrzymanego azotanu(V) glukozy, ten warunek byłby spełniony. Ponadto azotan(V) glukozy jest zbliżony, pod względem budowy cząsteczki, do wolnej glukozy. Zatem mogę oczekiwać, że nowo zsyntetyzowana substancja będzie rozpoznawana przez transportery glukozy, co powinno wydajnie zwiększyć jej dystrybucję i biodostępność.

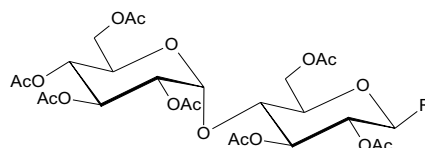
Skoro azotan(V) glukozy wydaje się być interesującym kandydatem do badań biologicznych, to warto jest najpierw uzyskać jego pełną charakterystykę fizykochemiczną. Pomimo wielu prób krystalizacji, nie udało się mi wyhodować odpowiedniego monokryształu, dla którego można by wykonać pomiar SCXRD. W celu uzyskania struktury cząsteczki nowo otrzymanego związku, wykorzystałem dostępną strukturę jego prekursora w syntezie. Do struktury α -D-glukozydu metylu uzyskanej z pomiarów SCXRD dołączyłem grupę nitrową i przeprowadziłem dalsze udokładnienie metodą DFT. Taki zabieg niekoniecznie mógł doprowadzić do poprawnej konformacji cząsteczki azotanu(V) glukozy. W celu weryfikacji przeprowadzonych obliczeń zastosowałem ssNMR. Wartość współczynnika korelacji między teoretycznymi i eksperymentalnymi przesunięciami chemicznymi dla azotanu(V) glukozy, potwierdziła skuteczność wybranej przeze mnie metody.

W pracy tej wyznaczyłem również niedostępną strukturę cząsteczki 4,6-O-etylideno- α -D-glukopiranozydu metylu, który był substancją pośrednią na drodze syntezy azotanu(V) glukozy. Tym razem z dostępnej struktury krystalograficznej dla 3-O-nitro-4,6-O-etylideno- α -D-glukopiranozydu metylu usunąłem grupę nitrową i postępowałem w sposób analogiczny do powyżej opisanego przypadku. Również i dla 4,6-O-etylideno- α -D-glukopiranozydu metylu udało się mi prawidłowo określić konformację cząsteczki w cieple stałym.

H10. J. Bukowicki, **T. Gubica***, Ł. Szeleszczuk. "Time-effective and reliable solid-state structure evaluation of selected peracetylated β -maltose derivatives by means of grid search, genetic algorithm and DFT calculations" *Tetrahedron* **2014**, 70, 4008-4016.

Celem omawianej pracy było opracowanie metody obliczeniowej, która w możliwie najkrótszym czasie przewidywałaby strukturę cząsteczki sfunkcjonalizowanych dwucukrów. Zgodnie z moim oglądem literatury, w artykule H8 jako pierwszy zastosowałem algorytm genetyczny do przeszukiwania przestrzeni konformacyjnej podstawionych dwucukrów. Poprzednio, znaleziona teoretycznie konformacja dość dobrze odwzorowywała strukturę eksperymentalną. Tym razem chciałem uzyskać jeszcze lepsze dopasowanie struktury pochodzącej z obliczeń i SCXRD. Ponadto, zamierzałem skrócić maksymalnie czas obliczeń. Nie zależało mi tym razem na tworzeniu prawdziwych map adiabatycznych, lecz jedynie na wytypowaniu obszarów, które charakteryzowałyby się najmniejszą energią. Zamieniłem dotychczas używane pole siłowe (MM3) na lepiej sparametryzowane (MMFF94). Sprawdzałem również wpływ różnych wartości stałych dielektrycznych ($\epsilon = 1, 4$ i 8).

Jako obiekt badań wybrałem trzy peracetylowane pochodne maltozy (Rys. 14). Maltoza jest dimerem skrobi, zatem analiza konformacyjna jej pochodnych zbliża nas do zrozumienia budowy tego ważnego biopolimeru.

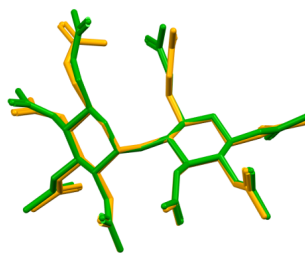


peracetylo- β -maltoza: R = OAc
peracetylo- β -maltozyd metylu: R = OMe
peracetylo- β -tiomaltozyd etylu: R = SEt

Rys. 14. Pochodne maltozy.

Dla peracetylo- β -maltozy dostępna była struktura krystalograficzna w literaturze.³⁷ Dla dwóch pozostałych pochodnych maltozy nie udało się mi wyhodować odpowiednich monokryształów do analizy SCXRD, nie było też dla nich wcześniej opublikowanych struktur kryształu.

W wyniku przeprowadzonej analizy konformacyjnej wytypowałem strukturę cząsteczki peracetylo- β -maltozy, która była bardzo zbliżona do struktury uzyskanej z pomiarów SCXRD (Rys. 15).



Rys. 15. Konformacje peracetylo- β -maltozy: obliczona (zielona) i eksperymentalna (żółta).

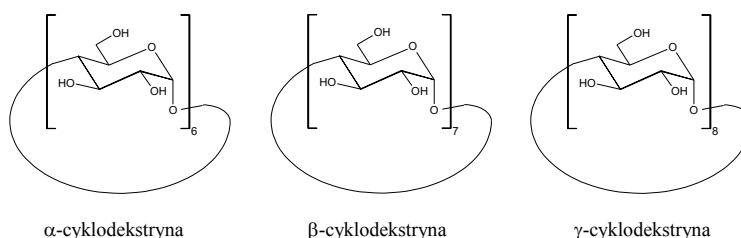
Dla pozostałych maltozydów teoretycznie przewidziane konformacje zostały zweryfikowane za pomocą ssNMR. Współczynniki korelacji zależności teoretycznych i eksperymentalnych przesunięć chemicznych dla tych dwóch maltozydów były jeszcze lepsze niż dla peracetylo- β -maltozy. Dlatego też uważam, że dla pozostałych dwóch pochodnych maltozy, dla których brakuje struktur krystalograficznych, uzyskałem wiarygodne konformacje w cieple stałym.

H11. **T. Gubica***, K. Pałka, Ł. Szeleszczuk, M. Kańska. “Enhanced enzymatic activity of phenylalanine dehydrogenase caused by cyclodextrins” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, 118, 89-94.

Dehydrogenaza fenyloalaninowa jest enzymem, który katalizuje wzajemne przekształcanie fenyloalaniny i kwasu fenylopirogroonowego. Kierunek tych biotransformacji zależy od pH roztworu, obecności różnych kofaktorów i amoniaku. Enzym ten znalazł zastosowanie w biotechnologicznej syntezie fenyloalaniny.³⁸⁻⁴⁰ Ponadto wykorzystywany jest do kolorymetrycznego^{41,42} i elektrochemicznego^{43,44} oznaczania stężenia fenyloalaniny u noworodków (w związku z wczesnym wykrywaniem fenyloketonurii).

Ważne zastosowania dehydrogenazy fenyloalaninowej skłoniły mnie do badań mających na celu zwiększenie aktywności i selektywności tego enzymu. Takie badania były też podejmowane przez inne zespoły badawcze.⁴⁵⁻⁴⁸ Wśród cytowanej literatury jest praca⁴⁸ poświęcona chemicznym modyfikacjom tego enzymu. Opisano w niej właściwości dehydrogenazy fenyloalaninowej, do której dołączono kowalencyjnie pochodne cyklodekstryn. Powstałe połączenia cyklodekstryn i dehydrogenazy fenyloalaninowej wykazywały mniejszą aktywność enzymatyczną przy zwiększonej selektywności nowo powstałego enzymu. Ponadto poprawiła się też stabilność termiczna modyfikowanej dehydrogenazy fenyloalaninowej. Mimo że skutecznie poprawiono parametry tego enzymu, to nakład pracy syntetycznej był bardzo wysoki.

W mojej pracy chciałem maksymalnie uprościć przebieg eksperymentów. Skoro cyklodekstryny wpływały korzystnie na dehydrogenazę fenyloalaninową będąc kowalencyjnie dołączone do cząsteczek enzymu, to być może sama ich obecność w mieszaninie reakcyjnej, jako zwykłe składniki roztworu, byłaby wystarczająca. Do badań wybrałem trzy podstawowe natywne cyklodekstryny (Rys. 16).



Rys. 16. Natywne cyklodekstryny.

Obie biotransformacje, tj. wzajemne przekształcanie fenyloalaniny i kwasu fenylopirogronowego, badałem w obecności cyklodekstryn w stosunku molowym do substratu 1:1 i 2:1. W drugim przypadku, nawet przy założeniu zużycia jednego ekwiwalentu cyklodekstryny do powstania kompleksów inkluzyjnych z fenyloalaniną bądź kwasem fenylopirogronowym, druga porcja zostawałaby w roztworze i mogłaby wykazywać oddziaływanie z enzymem.

Zgodnie z przeprowadzonymi eksperymentami stwierdziłem ponaddwukrotne zwiększenie stałej szybkości obu biotransformacji wywołane obecnością cyklodekstryn. Wzmoczona aktywność enzymatyczna, moim zdaniem, spowodowana była korzystnym wpływem cyklodekstryn na zmiany konformacyjne enzymu podczas zachodzenia procesów biokatalizy.

Zauważyłem również sześciokrotne zwiększenie powinowactwa dehydrogenazy fenyloalaninowej do fenyloalaniny w obecności cyklodekstryn. Z kolei dla drugiej przemiany, zaobserwowałem trzykrotne zmniejszenie specyficzności enzymu do kwasu fenylopirogronowego. W celu wyjaśnienia tych różnic posłużyłem się modelowaniem molekularnym kompleksów inkluzyjnych cyklodekstryn i substratów badanych biotransformacji. Z wymodelowanych struktur jasno wynika, że oba substraty w odmienny sposób lokują się we wnętrze molekularnej cyklodekstryny. Grupy funkcyjne fenyloalaniny ułożone są bliżej węższej krawędzi cyklodekstryny, czyli tam, gdzie znajdują się pierwszorzędowe grupy hydroksylowe cyklodekstryn. Z kolei grupy funkcyjne kwasu fenylopirogronowego preferują szerszą krawędź cyklodekstryn i mają w najbliższym otoczeniu drugorzędowe grupy hydroksylowe cząsteczki gospodarza. Dwukrotnie większa liczba grup hydroksylowych przy szerszej krawędzi cyklodekstryn powoduje prawdopodobnie zwiększenie siły wiązań wodorowych w

kompleksach z kwasem fenylopirogronowym. Dlatego też kompleksy te powinny trudniej dysocjować w porównaniu do układu fenyloalanina-cyklodekstryna.

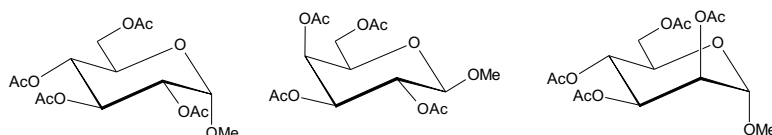
Odkrycie zwiększonego powinowactwa dehydrogenazy fenyloalaninowej do fenyloalaniny w obecności cyklodekstryn może być wykorzystane do ulepszenia czujników elektrochemicznych zawierających ten enzym.

H12. Ł. Szeleszczuk, **T. Gubica***, A. Zimniak, D.M. Pisklak, K. Dąbrowska, M.K. Cyrański, M. Kańska. “The potential for the indirect crystal structure verification of methyl glycosides based on acetates’ parent structures: GIPAW and solid-state NMR approaches” *Chemical Physics Letters* **2017**, 686, 7-11.

Wiele leków to chlorowodorki czy cytryniany odpowiednich amin, np. fluoksetyna i sildenafil podawane są jako sole kwasu solnego i cytrynowego. Takie pochodne wykazują zwiększoną trwałość i rozpuszczalność w wodzie co poprawia ich biodostępność. Chlorowodorki, cytryniany czy też octany (aspiryna) chętniej też tworzą monokryształy, które nadają się do pomiarów SCXRD. W swojej pracy badawczej wiele razy napotkałem trudności z uzyskaniem odpowiednich kryształów pochodnych cukrów z wolnymi grupami hydroksylowymi. Natomiast dla octanów cukrów, którymi się zajmowałem, wyhodowanie odpowiedniego kryształu nie było aż tak uciążliwe jak w przypadku niesfunkcjonalizowanych pochodnych.

Celem omawianej pracy było znalezienie metody, która pozwalałaby uzyskać dane strukturalne pochodnych cukrów z wolnymi grupami hydroksylowymi w oparciu o pomiary SCXRD dla analogicznych octanów.

Dla trzech acetylowanych glikozydów metylu, pochodnych glukozy, galaktozy i mannozy, wykonane zostały pomiary SCXRD (Rys. 17).



Rys. 17. Octany glikozydów metylu.

W uzyskanych strukturach cząsteczek zamieniłem grupy acetylowe na grupy hydroksylowe. Następnie przeprowadzono obliczenia DFT z uwzględnieniem periodyczności sieci krystalicznej. Informacje niezbędne do tych obliczeń, czyli parametry komórek elementarnych

oraz grupy przestrzenne kryształów glikozydów metylu z wolnymi grupami hydroksylowymi były dostępne w literaturze z pomiarów dyfrakcji neutronowej.^{49,50} W przypadku braku takich danych z łatwością można posłużyć się metodą PXRD, która pozwala wyznaczyć podstawowe parametry fazy krystalicznej.

W sytuacji, kiedy dostępne są dane z dyfrakcji rentgenowskiej bądź neutronowej na monokryształ, nietrudno jest sprawdzić poprawność przewidzianej konformacji cząsteczek w cieple stałym. Wykazałem jednak, że nasza metoda może być zastosowana nawet wtedy, gdy nie są dostępne dane z dyfrakcji na monokryształ. Zastosowałem prosty ale bardzo skuteczny eksperyment ¹³C CP/MAS NMR. Po każdej optymalizacji geometrii wykonano obliczenia GIPAW przesunięć chemicznych. Struktury teoretyczne i eksperymentalne pochodnych glukozy i galaktozy były bardzo zbliżone do siebie na co wskazywały wartości RMSD położenia atomów i R² korelacji obliczonych i eksperymentalnych przesunięć chemicznych. W przypadku pochodnej mannozy zauważyłem rozbieżności między teoretycznymi i eksperymentalnymi przesunięciami chemicznymi dla atomów C4 i C6 (różnice powyżej 5 ppm). Wskazywało to na nieprawidłowo wymodelowane ułożenie grupy hydroksylowej przy terminalnym atomie węgla pochodnej mannozy. W związku z czym przesunięto grupę hydroksylową przy tym atomie węgla o 120° i przeprowadzono kolejne udokładnienie geometrii. Jedna z nowo wymodelowanych struktur bardzo dobrze odwzorowywała konformację rzeczywistą (znalezioną na podstawie dyfrakcji neutronowej).

Podsumowanie

Na przedstawione osiągnięcie naukowe składa się cykl dwunastu publikacji prezentujących badania strukturalne i enzymatyczne pochodnych sacharydów o spodziewanej aktywności biologicznej. Łącznie opracowałem metody syntezy czterdziestu dwóch związków organicznych, w tym dziesięciu nowych. Otrzymane przeze mnie pochodne sacharydów oraz dziesięć handlowych substancji scharakteryzowałem pod względem właściwości ciała stałego bądź zachowania się w roztworze jako substancje kompleksujące. Moje badania mają następujące znaczenie w dziedzinie nauk farmaceutycznych:

- wytypowałem dwie pochodne cyklodekstryn spośród dziewięciu badanych, które mogą być użyte w celu zwiększenia biodostępności tryptofanu, który jest substancją wykazującą aktywność farmakologiczną, stosowaną w leczeniu depresji (publikacja H2)
- odkryłem aktywację liazы fenyloalaninowej wywołaną obecnością natywnej i eterowanej cyklodekstryny. Obie te pochodne mogą być użyte do mikrokapsulowania tego enzymu.

Stosowanie liazы фенyлоаланyновой w połączeniu z cykloдекстрынами rozpatrywane jest obecnie jako dogodna terapia фенyлокетонурii. (publikacja H4)

- opisałem właściwości strukturalne β -D-ksylozydów nitroфенyлу, których pochodne wykazują właściwości przeciwwzkrzepowe (publikacja H6)
- scharakteryzowałem pod względem fizykochemii ciała stałego ksylozyloaminy nitroфенyлу, których najbliższe analogii posiadają właściwości przeciwgrzybicze (publikacja H5)
- poddałem badaniom strukturalnym cztery dwucukry połączone atypowym wiązaniem glikozydowym, dla których postuluje się wykazywanie niskiego indeksu glikemicznego podobnie do izomaltulozy. Dwucukry te mają szanse stać się tak jak wspomniana izomaltuloza cennymi środkami dietetycznymi. (publikacje H7 i H8)
- otrzymałem i scharakteryzowałem pod względem strukturalnym nowy azotan(V) glukozy, który może być stosowany jako substancja lecznicza w chorobach sercowo-naczyniowych podobnie do triazotanu(V) glicerolu i monoazotanu izosorbidu (publikacja H9)
- odkryłem wzmożoną aktywność dehydrogenazy фенyлоаланyновой wywołaną obecnością cykloдекстрын. Zjawisko to można wykorzystać do modyfikacji biosensorów używanych do badań przesiewowych noworodków w kierunku фенyлокетонурii. (publikacja H11)

Odnosiniki literaturowe:

1. B. Cao, J. Du, D. Du, H. Sun, X. Zhu, H. Fu. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 149, 348-356.
2. R.B. Best, G.E. Jackson, K.J. Naidoo. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 5091-5098.
3. G.R. Barker, D.C.C. Smith. *J. Chem. Soc.* **1954**, 2151-2153.
4. A.G. Evdokimov, F. Frolow. *Acta Crystallogr., Sect. C* **1996**, 52, 3218-3219.
5. S. Takagi, G.A. Jeffrey. *Acta Crystallogr., Sect. B* **1978**, 34, 1591-1596.
6. S.G. Il'in, M.V. Reshetnyak, E.V. Evtushenko. *Chem. Nat. Compd.* **1986**, 21, 566-570.
7. V.J. James, J.D. Stevens, F.H. Moore. *Acta Crystallogr., Sect. B* **1978**, 34, 188-193.
8. T. Gubica, E. Boroda, A. Temeriusz, M. Kańska. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2006**, 54, 283-288.
9. T. Steiner, W. Saenger. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 3404-3407.
10. C. Fernandez-Castano, C. Foces-Foces. *Acta Crystallogr., Sect. C* **1996**, 52, 1586-1588.
11. B. Agianian, A. Perrakis, P.N. Kanellopoulos, B. Sheldrick, S.J. Hamodrakas. *Acta Crystallogr., Sect. C* **1997**, 53, 811-814.
12. R.M. Shah, A.P. D'mello. *Int. J. Pharm.* **2007**, 331, 107-115.
13. L. Bourget, T.M. Chang. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1984**, 10, 57-59.
14. R.M. Shah, A.P. D'mello. *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, 61-68.
15. X. Qian, Z. Li, Z. Liu, G. Song, Z. Li. *Carbohydr. Res.* **2001**, 336, 79-82.

16. F. Bellamy, D. Horton, J. Millet, F. Picart, S. Samreth, J.B. Chazan. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 898-903.
17. S. Samreth, V. Barberousse, F. Bellamy, D. Horton, Ph. Masson, J. Millet, P. Renaut, C. Sepulchre, J. Theveniaux. *Trends Recept. Res.* **1993**, *20*, 41-59.
18. F. Bellamy, V. Barberousse, N. Martin, P. Masson, J. Millet, S. Samreth, C. Sepulchre, J. Theveniaux, D. Horton. *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, *30*, 101s-115s.
19. S. Samreth, V. Barberousse, F. Bellamy, D. Horton, P. Masson, J. Millet, P. Renaut, C. Sepulchre, J. Theveniaux. *J. Actual. Chim. Ther.* **1994**, *21*, 23-33.
20. D. Jonker, B.A.R. Lina, G. Kozianowski. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1383-1389.
21. I. Holub, A. Gostner, S. Theis, L. Nosek, T. Kudlich, R. Melcher, W. Scheppach. *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 1730-1737.
22. S. Perez, M. Kouwijzer, K. Mazeau, S.B. Engelsens. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 307-321.
23. M.M. Kuttel, K.J. Naidoo. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 875-879.
24. C.A. Stortz, A.D. French. *Mol. Simul.* **2008**, *34*, 373-389.
25. A.D. French, A.M. Kelterer, G.P. Johnson, M.K. Dowd, C.J. Cramer. *J. Mol. Graph.* **2000**, *18*, 95-107.
26. C.A. Stortz. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322*, 77-86.
27. D.E. Goldberg. *Genetic Algorithms for Search, Optimization, and Machine Learning*, Addison-Wesley, **1989**.
28. J.O. Lundberg, E. Weitzberg. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 915-922.
29. L.J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, C. Napoli. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *34*, 879-886.
30. M.R. Miller, R.M. Wadsworth. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 565-567.
31. T. Munzel, A. Daiber, A. Mulsch. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 618-628.
32. U. Thadani, T. Rodgers. *Expert Opin. Drug Saf.* **2006**, *5*, 667-674.
33. A. Daiber, P. Wenzel, M. Oelze, T. Munzel. *Clin. Res. Cardiol.* **2008**, *97*, 12-20.
34. T. Munzel, H. Sayegh, B.A. Freeman, M.M. Tarpey, D.G. Harrison. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 187-194.
35. B. Brune, A. von Knethen, K.B. Sandau. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *351*, 261-272.
36. S. Hashimoto, A. Kobayashi. *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 205-221.
37. F. Brisse, R.H. Marchessault, S. Perez, P. Zugenmaier. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7470-7476.
38. W. Hummel, E. Schmidt, C. Wandrey, M.R. Kula. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1986**, *25*, 175-185.
39. W. Hummel, H. Schutte, E. Schmidt, C. Wandrey, M.R. Kula. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *26*, 409-416.
40. H.Y. Cho, K. Soda. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1216-1218.
41. U. Wendel, W. Hummel, U. Langenbeck. *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 91-94.
42. M.A. Vilaseca, C. Farre, F. Ramon. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 129-131.
43. S.M. Naghib, M. Rabiee, E. Omidinia. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2014**, *9*, 2301-2315.
44. S.M. Naghib, M. Rabiee, E. Omidinia, P. Khoshkenar. *Electroanalysis* **2012**, *24*, 407-417.
45. S. Chen, P.C. Engel. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1407-1411.
46. R. Villalonga, S. Tachibabna, R. Cao, M. Matos, Y. Asano. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 471-475.
47. F. Paradisi, S. Collins, A.R. Maguire, P.C. Engel. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 408-411.
48. R. Villalonga, S. Tachibana, R. Cao, H.L. Ramirez, Y. Asano. *Biochem. Eng. J.* **2006**, *30*, 26-32.
49. G.A. Jeffrey, R.K. McMullan, S. Takagi. *Acta Crystallogr. B* **1977**, *33*, 728-737.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Podczas realizacji pracy doktorskiej zajmowałem się syntezą pochodnych sacharydowych nitrofenolu i nitroaniliny oraz badaniami strukturalnymi i elektrochemicznymi uzyskanych substancji. Chociaż większość z otrzymanych przeze mnie związków organicznych była znana, to zawsze starałem się udoskonalić drogę syntezy opisaną w literaturze. W ramach pracy doktorskiej otrzymałem sześć nowych związków chemicznych, w tym trzy pochodne cyklodekstryn. Dwanaście nitrofenylowych pochodnych sacharydów zostało zmierzonych metodami SCXRD i ^{13}C CP/MAS NMR. Dla większości otrzymanych przeze mnie pochodnych nitrofenylowych sacharydów wykonałem pomiary elektrochemiczne (woltamperometria cykliczna i chronokulometria) na elektrodzie WKER. W oparciu o uzyskane dane strukturalne wyjaśniłem różnice zaobserwowane w parametrach elektroredukcji grupy nitrofenylowej. Ta elektroaktywna grupa była wrażliwa nawet na absolutną konfigurację atomu węgla w części cukrowej cząsteczki.

Już w czasie przygotowywania pracy doktorskiej zająłem się badaniem wpływu cyklodekstryn na procesy enzymatyczne. Tematyka ta nie została włączona do dysertacji doktorskiej a publikacja z tego okresu (w *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.*) nie jest przedmiotem prezentowanego osiągnięcia naukowego.

Po obronie doktoratu, oprócz pracy zmierzającej do powstania cyklu publikacji habilitacyjnych, dokończyłem rozpoczęte wcześniej badania elektrochemiczne. Wyniki tych badań opublikowałem w trzech artykułach w wymagających periodykach.

Dzięki nawiązaniu współpracy z Panią dr H. Boruczkowską z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, dla której wykonałem pomiary ^{13}C CP/MAS NMR modyfikowanych enzymatycznie próbek skrobi, ukazał się nasz wspólny artykuł w cenionym czasopiśmie specjalistycznym *Starch-Starke*.

6. Lista artykułów przed uzyskaniem stopnia doktora

1. A. Temeriusz*, T. Gubica, P. Rogowska, K. Paradowska, M.K. Cyrański. "Crystal structure and solid state ^{13}C NMR analysis of nitrophenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosides and D-galactopyranosides" *Carbohydrate Research* **2005**, 340, 1175-1184. IF 1,669. MNiSzW 20.
2. A. Temeriusz*, T. Gubica, P. Rogowska, K. Paradowska, M.K. Cyrański. "Crystal structure and solid state ^{13}C NMR analysis of *N-p*-nitrophenyl- α -D-ribosepyranosylamine,

N-p-nitrophenyl- α -D-xylopyranosylamine, and solid state ^{13}C NMR analysis of *N-p*-nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-lyxopyranosylamine and *N-p*-nitrophenyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- α -L-arabinopyranosylamine” *Carbohydrate Research* **2005**, 340, 2645-2653. IF 1,669. MNiSzW 20.

3. **T. Gubica**, E. Boroda, A. Temeriusz*, M. Kańska. “Effects of Native and Permethylated Cyclodextrins on the Catalytic Activity of L-Tryptophan Indole Lyase” *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2006**, 54, 283-288. IF 1,251. MNiSzW 15.
4. A. Temeriusz*, **T. Gubica**, P. Rogowska, K. Paradowska, M.K. Cyrański. “Crystal structure and solid-state ^{13}C NMR analysis of *N-o*-, *N-m*- and *N-p*-nitrophenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylamines, and their *N*-acetyl derivatives” *Carbohydrate Research* **2006**, 341, 2581-2590. IF 1,703. MNiSzW 20.
5. **T. Gubica**, J. Stroka, A. Temeriusz*. “Synthesis and electrochemical study of nitrophenyl derivatives of β -cyclodextrin” *Journal of Physical Organic Chemistry* **2007**, 20, 375-383. IF 1,594. MNiSzW 20.

7. Lista artykułów po uzyskaniu stopnia doktora nie wchodzących do prezentowanego osiągnięcia naukowego

1. **T. Gubica**, A. Temeriusz*, P. Pawłowski, J. Stroka. “Molecular structure of nitrophenyl *O*-glycosides in relation to their redox potentials” *Journal of Physical Organic Chemistry* **2010**, 23, 853-858. IF 1,478. MNiSzW 20.
2. **T. Gubica***, J. Stroka, A. Temeriusz, M. Kańska. “Cyclic voltammetry of nitrophenyl *N*-glycosides on mercury electrode” *Journal of Physical Organic Chemistry* **2011**, 24, 1229-1234. IF 1,963. MNiSzW 20.
3. **T. Gubica***, M. Mazur, Ł. Szeleszczuk, A. Temeriusz, M. Kańska. “The influence of native and methylated β -cyclodextrin on the electroreduction of nitrophenyl glycosides” *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2013**, 699, 40-47. IF 2,871. MNiSzW 30.
4. H. Boruckowska*, T. Boruckowski, **T. Gubica**, M. Anioł, E. Tomaszewska-Ciosk. “Analysis of the chemical structure of insoluble products of enzymatic esterification of starch and transesterification of acetylated starch with oleic acid by solid-state CP/MAS ^{13}C NMR” *Starch-Starke* **2016**, 68, 1180-1186. IF 1,837. MNiSzW 25.

8. Czynny udział w konferencjach naukowych

1. P. Rogowska, **T. Gubica**, M.K. Cyrański, T.M. Krygowski, A. Temeriusz, K. Paradowska. „Synteza i badania strukturalne *N*-glikopiranozydów“. XLVI Zjazd PTChem i SITPChem, Lublin 2003. (plakat)
2. **T. Gubica**, P. Pawłowski, J. Stroka, A. Temeriusz. “Electrochemical Study of Nitrophenyl *O*-Glycopyranosides Reduction on the Mercury Electrode“. International Conference on Electrode Processes, Szczyrk 2004. (plakat)
3. **T. Gubica**, E. Boroda, A. Temeriusz, M. Kańska. “Effects of Native and Permethylated Cyclodextrins on the Catalytic Activity of L-Tryptophan Indole Lyase“. 13th European Carbohydrate Symposium, Bratislava, Slovakia 2005. (plakat)
4. **T. Gubica**, J. Stroka, A. Temeriusz. “Synthesis and Study of Electrochemical Behaviour of New Nitrophenyl Derivatives of β -Cyclodextrin“. 13th International Cyclodextrin Symposium, Torino, Italy 2006. (plakat)
5. E. Winnicka, **T. Gubica**, M. Kańska, A. Temeriusz. “The Influence of Selected Alkyl Derivatives of Cyclodextrins on the Catalytic Activity of L-Tryptophan Indole Lyase“. 3rd ERA Chemistry “Flash” Conference, Killarney, Ireland 2008. (plakat)
6. **T. Gubica**, P. Pawłowski, J. Stroka, A. Temeriusz, Z. Galus. “The Influence of Molecular Structure of Nitrophenyl *O*-Glycopyranosides on their Electrochemical Properties“. 19th IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry, Santiago de Compostela, Spain 2008. (prezentacja ustna)
7. **T. Gubica**, J. Stroka, A. Temeriusz. „Woltamperometria cykliczna na elektrodzie rtęciowej (WKER) nitrofenyloowych glikozyloamin“. 51. Zjazd PTChem i SITPChem, Opole 2008. (prezentacja ustna)
8. **T. Gubica**, A. Temeriusz, K. Paradowska, A. Ostrowski, P. Klimentowska, M.K. Cyrański. “Structural analysis of *p*-nitrophenyl glycosides“. 10th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry, Florianópolis, Brazil 2009. (wykład)
9. **T. Gubica**, A. Temeriusz, D.K. Stępień, J. Bukowicki, A. Ostrowski, D.M. Pisklak, M.K. Cyrański. “Comprehensive structural analyses of disaccharides with unusual linkage“. 26th International Carbohydrate Symposium, Madrid, Spain 2012. (prezentacja ustna)
10. **T. Gubica**, M. Mazur, Ł. Szeleszczuk, A. Temeriusz, M. Kańska. “The influence of native and methylated β -cyclodextrin on the electroreduction of nitrophenyl glycosides“. 17th European Carbohydrate Symposium, Tel-Aviv, Israel 2013. (prezentacja ustna)

11. **T. Gubica**, Ł. Szeleszczuk, D.M. Pisklak, D.K. Stępień, M.K. Cyrański. "Reliable evaluation of molecular structure of carbohydrates by CP/MAS NMR spectroscopy and DFT optimization in the absence of crystallographic data". 27th International Carbohydrate Symposium, Bangalore, India 2014. (prezentacja ustna)

9. Współpraca z jednostkami naukowymi

1. Zespół prof. dr hab. Michała K. Cyrańskiego. Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski. Pomiary dyfrakcji rentgenowskiej monokryształów.
2. Zespół prof. dr hab. Marianny Kańskiej. Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski. Badania nad aktywnością katalityczną enzymów w obecności cyklodekstryn.
3. Dr hab. Maciej Mazur, prof. UW. Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski. Pomiary elektrochemiczne.
4. Dr Andrzej Ostrowski. Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska. Pomiary dyfrakcji rentgenowskiej proszków.
5. Dr Hanna Boruczkowska. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu. Pomiary ¹³C CP/MAS NMR.

9. Granty

1. Grant promotorski KBN (1 T09A 001 30) „Synteza i badania elektrochemiczne nitrofenylowych pochodnych sacharydów w obecności natywnej i permetylowanej β-cyklodekstryny”. Czas realizacji: 18 miesięcy (2006-07). Główny wykonawca.
2. Grant Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego „Młodzi Naukowcy” (FW28/PM1/11) „Synteza i kompleksowe badania strukturalne pochodnych sacharydów stosowanych w enzymologii”. Czas realizacji: 2 lata (2011-12). Kierownik i główny wykonawca.

10. Recenzje

W latach 2009-18 przygotowałem recenzje 21 manuskryptów w następujących czasopismach (w nawiasie liczba recenzowanych artykułów): *Carbohydrate Research* (3), *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego WUM* (7), *Trends in Food Science and Technology* (1), *RSC Advances* (1), *Journal of Chemical and Engineering Data* (1), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1), *Pure and Applied Chemistry* (1), *Molecular Physics* (3), *Monatshefte für Chemie* (1), *Journal of Molecular Structure* (1), *Current Pharmaceutical Analysis* (1), *Molbank* (1), *Nutrition and Dietary Supplements* (1), *Information Processing in Agriculture* (1).

W 2013 r. przygotowałem 2 recenzje (podręcznika akademickiego i książki popularno-naukowej) dla czasopisma *Przemysł Chemiczny*.

11. Osiągnięcia dydaktyczne

Kierownictwo i opieka nad pracami magisterskimi:

1. „Synteza pochodnych 6-monoamino- β -cyklodekstryny” A. Bartodziej (r. akad. 2003/04)
2. „Elektrochemiczne właściwości nitrofenyloglikopiranozydów” P. Pawłowski (r. akad. 2003/04)
3. „Badanie reakcji elektrodowych nitrofenyloglikopiranozydów metodami elektrochemicznymi” M. Stasiewicz (r. akad. 2004/05)
4. „Wpływ *per*(2,3,6-tri-*O*-2'-metoksyetylo)- α -cyklodekstryny na katalityczną aktywność L-tryptofan indol liazy” M. Rackiewicz (r. akad. 2005/06)
5. „Oddziaływania pomiędzy modyfikowanymi cyklodekstrynami a L-tryptofan indol liazą” A. Minkowska (r. akad. 2006/07)
6. „Zmiana aktywności L-tryptofan indol liazy w obecności modyfikowanych cyklodekstryn” K. Ferszt (r. akad. 2006/07)
7. „Wpływ pochodnych cyklodekstryn na reologiczne właściwości mikro- i nanoproszków ceramicznych” I. Żeglińska (r. akad. 2007/08)
8. „Wpływ natywnych i selektywnie *O*-metylowanych pochodnych cyklodekstryn na aktywność katalityczną enzymu liazy fenyloalaninowej” A. Pełka (r. akad. 2009/10)
9. „Synteza i rentgenowska analiza strukturalna wybranych pochodnych 2,3,4-tri-*O*-acetylo- β -D-ksylopiranozyloaminy oraz 2,3,4-tri-*O*-acetylo- β -D-ksylopiranozydu” E. Głowacka (r. akad. 2011/12)
10. „Analiza konformacyjna pochodnych maltozy za pomocą algorytmu genetycznego i spektroskopii NMR dla ciała stałego” M. Mądra (r. akad. 2012/13)
11. „Próba zastąpienia dyfrakcji rentgenowskiej obliczeniami teoretycznymi i spektroskopią NMR w celu określenia konformacji pochodnych celobiozy” W. Jaszczak (r. akad. 2015/16)

Kierownictwo i opieka nad pracami licencjackimi:

1. „Próby syntezy i charakterystyki kompleksów inkluzyjnych L-fenyloalaniny z cyklodekstrynami” K. Szubstarska (r. akad. 2009/10)

2. „Próby syntezy i charakterystyki kompleksów inkluzyjnych L-tryptofanu z cyklo-dekstrynami” K. Walicka (r. akad. 2009/10)
3. „Próby syntezy i charakterystyki kompleksów inkluzyjnych L-tyrozyny z cyklo-dekstrynami” M. Wajk (r. akad. 2009/10)

Prowadzenie zajęć dydaktycznych:

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM:

1. Ćwiczenia Laboratoryjne z Chemii Fizycznej (kierunek: Farmacja) (od r. akad. 2010/11 do chwili obecnej; kierownik przedmiotu od r. akad. 2011/12 do 2014/15)
2. Ćwiczenia Laboratoryjne z Chemii Fizycznej (kierunek: Analityka medyczna) (r. akad. 2010/11 i od 2013/14 do chwili obecnej)
3. Ćwiczenia Rachunkowe z Chemii Fizycznej (kierunek: Farmacja) (r. akad. 2014/15, 2015/16, 2017/18; kierownik przedmiotu w r. akad. 2015/16)

Wydział Chemii UW:

1. Pracownia Chemii Organicznej I (r. akad. 2002/03)
2. Pracownia z Syntezy Organicznej (r. akad. 2003/04)
3. Proseminarium z Podstaw Chemii Organicznej (r. akad. 2004/05)
4. Pracownia Identyfikacji Związków Organicznych (od r. akad. 2007/08 do 2009/10)
5. Proseminarium z Identyfikacji Związków Organicznych (od r. akad. 2007/08 do 2009/10)
6. Pracownia Chemii Organicznej dla studentów Wydziału Biologii UW (r. akad. 2007/08)

Autorstwo materiałów dydaktycznych:

Jestem redaktorem i współautorem skryptu dla studentów farmacji i analityki medycznej: M. Dudek, **T. Gubica**, S. Kaźmierski, K. Paradowska, D.M. Pisklak, J. Sajkowska-Kozielewicz, Ł. Szeleszczuk, K. Zawada, A. Zielińska: Ćwiczenia laboratoryjne z chemii fizycznej. Wydanie VI. Oficyna Wydawnicza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa 2015, ISBN 978-83-7637-334-8.

12. Działalność popularyzatorska

1. Przygotowanie pokazu ciekawych doświadczeń chemicznych w Laboratorium Dydaktyki Chemii dla uczniów gimnazjów (Wydział Chemii UW, 2001 r.)

2. Przygotowanie pokazu ciekawych doświadczeń chemicznych podczas V Festiwalu Nauki (Wydział Chemii UW, 2001 r.)
3. Prowadzenie warsztatów dla uzdolnionej młodzieży w ramach Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci (Wydział Chemii UW, 2010 r.)
4. Wygłoszenie wykładu „Wykorzystanie spektroskopii NMR do badań strukturalnych pochodnych sacharydów” dla Studenckiego Koła Naukowego „Free Radicals” (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM, 2012 r.)
5. Wygłoszenie wykładu „Miażdż cyklodekstryn z amoniakolizacją fenyloalaninową nadzieją dla chorych na fenylketonurię” podczas seminarium dla nauczycieli szkół warszawskich „Co wspomaga nasze zdrowie, czyli o suplementach diety” (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM, 2014 r.)
6. Prowadzenie warsztatów „Odkryj nasz Wydział” dla uczniów liceów (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej WUM, 2017 r.)

13. Podsumowanie dorobku naukowego

Liczba wszystkich artykułów: **21**

Liczba artykułów po doktoracie: **16**

Pierwszy autor w **14** artykułach

Autor korespondencyjny w **11** artykułach

Sumaryczny IF (zgodnie z rokiem opublikowania): **40,597**

Suma punktów MNiSzW: **506**

Liczba wszystkich (w nawiasie z wyłączeniem własnych) cytowań: **77 (49)** (wg bazy Web of Science®)

Indeks Hirscha: **5** (wg bazy Web of Science®)

J. Gubice