



UNIwersytet  
Warszawski



Warszawa, dn. 8.05.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Michała Siudema, zatytułowanej  
„Analiza strukturalna i fizykochemiczna wybranych ligandów receptora TRPV1”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Pawła Michała Siudema jest wynikiem pracy wykonanej w Katedrze Farmacji Fizycznej i Bioanalizy, w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. n. farm. Katarzyny Paradowskiej.

Rozprawę doktorską tworzy 10 rozdziałów. Rozpoczyna ją liczący 43 strony wstęp literaturowy, poprzedzony odpowiednim wstępem oraz przedstawieniem celów pracy. Są one stosunkowo obszerne i zawierają szereg aspektów strukturalnych, metodologicznych, analitycznych i biologicznych. Ponieważ receptor TRPV1 jest jednym z nadrzędnych dla prawidłowego działania organizmu człowieka, biorąc udział w przewodzeniu impulsów bólowych, ale również będąc zaangażowany w patogenezę wielu jednostek chorobowych w pracy przeanalizowane zostały związki które stanowią jego ligandy – przede wszystkim kapsaicyna i jej pochodne (dihydrokapsaicyna, noniwamid) oraz piperyna. Ponadto przeanalizowana została kurkumina, której pochodne charakteryzują się odpowiednim oddziaływaniem z receptorem TRPV1; włączone zostały również suplementy diety zawierające ten układ chemiczny. Znaczącym rozwinięciem badań strukturalnych było również przeanalizowanie aktywności ligandów w odniesieniu do kinazy Aurory A. Analiza kolejnego układu, który może oddziaływać z ligandem receptora TRPV1 bisfenolu A w kontekście ustalenia potencjalnego receptora estrogennego na jaki może oddziaływać ten związek jak również produkty jego rozkładu, także inne aspekty związane z ich toksycznością oraz określenie wpływu kapsaicyny, dihydroksykapsaicyny, noniwamidu, kurkuminy i piperyny na receptory estrogenowe było kolejnym ważnym celem przedstawionej dysertacji.

Następny rozdział poświęcony jest używanym metodom badawczym włączając w to spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego, metodę dyfrakcji promieni rentgenowskich na materiale proszkowym, metody obliczeniowe, algorytm ewolucyjny,

Prof. dr hab. Michał K. Cyrański  
Pasteura 1  
02-093 Warszawa  
e-mail: mkc@chem.uw.edu.pl  
Tel: 22 55 26 360

dokowanie molekularne oraz test toksyczności na zarodkach *Danio rerio*. O ile części poświęcone badaniom spektroskopowym oraz metodom teoretycznym poświęcono dostatecznie dużo uwagi, uważam iż metoda dyfrakcji promieni rentgenowskich na materiale proszkowym została potraktowana marginalnie. Podstawy metodologiczne tej techniki są oczywiście bardzo obszerne, trudno jest oczekiwać by zostały przedstawione w sposób odpowiednio wyczerpujący, jednak w mojej ocenie powinny pojawić się elementy wskazujące na aspekty praktyczne, w szczególności w odniesieniu do tematyki pracy. Metoda ta nie tylko umożliwia identyfikację poszczególnych związków np. poprzez porównanie z dyfraktogramem wzorca, ale co niezwykle istotne, umożliwia określenie składu fazowego w przypadku występowania różnych odmian polimorficznych. Dzięki udokładnieniu metodą Rietvelda istnieje również możliwość określenia architektury kryształu, oczywiście z dużo mniejszą dokładnością niż ma to miejsce w przypadku metody dyfrakcji promieni rentgenowskich na monokryształach. Jak zauważa słusznie doktorant nie zawsze można uzyskać odpowiedniej jakości kryształy do badań, jednak w analizie ciała stałego nierzadko rekrytalizacja również jest niewskazana, ze względu na możliwość zmiany składu fazowego. Uważam, że ta niezwykle cenna technika mogłaby być szerzej wykorzystana w przypadku podjętych przez doktoranta problemów.

W następnej części przedstawione są aspekty metodologiczne. Brakuje mi w niej podania odnośników do producentów suplementów diety, zaś w odniesieniu do pomiarów wykonanych metodą magnetycznego rezonansu jądrowego oraz dyfrakcji promieni rentgenowskich na materiale proszkowym podanych temperatur pomiaru (domyślam się, że była to temperatura pokojowa). Uwaga ta jest o tyle istotna, iż jeden z analizowanych związków (piperyna) występuje w jednej z trzech odmian polimorficznych a temperatura może stabilizować jedną z form. W przypadku metody dyfrakcji brak jest również podanego źródła promieniowania rentgenowskiego. Bardzo obszerny jest rozdział przedstawiający uzyskane wyniki badań oraz ich dyskusję. Kolejne rozdziały są poświęcone przedstawieniu wniosków, przedstawione zostały skróty używane w pracy (są one miłym ukłonem w stosunku do czytelnika rozprawy), spis ilustracji, tabel, bibliografia licząca 133 pozycji literaturowych oraz lista publikacji autora (zarówno tych które ściśle wiążą się z tematyką przedstawionej dysertacji jak i z innymi projektami). Całość liczy 155 stron. Wydaje mi się, iż pracy mogłoby również znaleźć się streszczenie w języku angielskim, co z pewnością zwiększyło jej dostępność dla czytelnika nie znającego języka polskiego. Nie jest to wymaganie formalne a należy nadmienić, iż część wyników badań została już opublikowana w ogólnie dostępnych czasopiśmie, również w języku angielskim. Na wstępie pragnę zaznaczyć, iż zapoznanie się z pracą sprawiło mi niemałą przyjemność intelektualną. Jej treść była dla mnie inspirująca a analiza wyników rozszerzyła moją wiedzę na temat

receptora TRPV1, ale również metodologii badań NMR substancji biologicznie aktywnych. Pragnę również podkreślić, iż jest ona obszerna zarówno w odniesieniu do zakresu wykonanych prac, obfituje w znaczący materiał eksperymentalny, jak również narzędzi metodologicznych, którymi posługuje się doktorant. Pomimo to jest napisana w sposób zwięzły.

Pierwszymi analizowanymi układami była kapsaicyna oraz jej pochodna dihydrokapsaicyna oraz analog noniwamid. Struktura krystaliczna tylko pierwszego z tych układów była do tej pory znana (na podstawie dyfrakcji na materiale proszkowym). Przedstawione przez doktoranta wyniki stanowią pierwsze wykorzystujące CPMAS NMR badania konformacyjne tych związków w ciele stałym. Analizując ten fragment nasunęły mi się pewne wątpliwości. Konformacja kapsaicyny na podstawie danych rentgenostrukturalnych jest zgięta, co również jest ujęte we wnioskach, jednak na stronie 87 doktorant pisze iż „porównanie różnic przesunięć chemicznych jest zaskakujące, ponieważ większe różnice obserwuje się dla zgiętej konformacji (PXR) niż dla tej z wyprostowanym łańcuchem (Cap(4)). Wydaje się więc prawdopodobne że w badanej próbce kapsaicyny występuje odmienna konformacja niż opisana w badaniu PXR Dawida i wsp. [112]”. Jak wynika również z przeprowadzonych przez niego analiz tego typu konformacja może być również obecna w roztworze. Jednak w przypadku ciała stałego świadczyłoby to o tym, iż w badaniach eksperymentalnych doktorant dysponował inną odmianą polimorficzną niż tą znaną z literatury. Byłoby to bardzo ważnym odkryciem, które łatwo jest potwierdzić korzystając np. z metody dyfrakcji na materiale proszkowym. Warto wrócić do tego eksperymentu i przy tej okazji również zarejestrować wykres DSC. Jeżeli układ może wykazywać znaczącą labilność konformacyjną być może krystalizacja z innych rozpuszczalników czy ucieranie w ciele stałym z różnymi układami (co-grinding) mogłaby doprowadzić do nowej architektury (ko)kryształu. Odnośnie noniwamidu autor pisze o występowaniu dwóch różnych konformacji w kryształach. Może tak się zdarzyć w przypadku dwóch niezależnych cząsteczek w komórce elementarnej, ale również istnienia odmian polimorficznych. Także i w tym przypadku jest to pole do dalszych analiz. W przypadku kurkuminy oprócz analizy konformacji na podstawie widm NMR doktorant identyfikuje analizowaną fazę. Jest to interesujące z poznawczego punktu widzenia, jednak zastosowanie dyfrakcji na materiale proszkowym doprowadziłoby go do tych samych wniosków, tyle że mniejszym nakładem pracy. W analizie jest jeszcze jeden praktyczny aspekt, a mianowicie opracowana metodologia pozwala na identyfikację kurkuminy w produktach naturalnych i wskazanie możliwych fałszerstw w odniesieniu do składu suplementów diety. Ważnym wnioskiem wyciągniętym przez doktoranta jest stwierdzenie, iż opracowana przez niego metodologia może być stosowana w rutynowej kontroli suplementów diety. Podobna

identyfikacja faz ma miejsce w przypadku piperyny, kolejnego niezwykle interesującego układu pochodzenia naturalnego. Za pomocą zaawansowanych pomiarów metodą magnetycznego rezonansu jądrowego wspomaganych obliczeniami doktorant dokonał identyfikacji odmiany polimorficznej. Było to pierwsze zastosowanie obliczeń GIPAW dla tego układu. Niewielkie różnice w odniesieniu do dyfraktogramu literaturowego mogą wynikać z efektu tekstury oraz innej temperatury pomiaru. Hipoteza, którą przedstawia doktorant, iż „podwojenia pików przy wartościach  $2\Theta=19.2^\circ$  i  $19.6^\circ$  oraz  $22.3^\circ$  i  $22.5^\circ$  może wynikać dodatkowo z zanieczyszczenia inną odmianą krystaliczną” można łatwo sprawdzić przeprowadzając analizę fazową. Autorzy cytowanej pracy (L.Y. Pfund i wsp. [*Cryst. Growth Des.* 2015] stwierdzają, iż piperyna jest układem minimum trimorficznym. Znow warto byłoby sprawdzić możliwości otrzymania innych polimorfów. To są naturalnie jedynie inspiracje, które nie ujmują kompleksowym analizom wykonanym przez doktoranta. Choć głównym tematem dysertacji są ligandy receptora TRPV1 doktorant postawił sobie za cel również przeanalizowanie potencjalnego wpływu analizowanych przez niego układów, wzbogaconych również o dodatkowe związki na kinazę Aurora A, której nadekspresja jest charakterystyczna dla chorób nowotworowych. Analizę tę wykonał w oparciu o dokowanie molekularne wykazując, iż zarówno kaspaina, dihydrokaspaina jak i kurkumina mogą hamować kinazę. Badania te powinny być kontynuowane, ponieważ mogą prowadzić do daleko idących konsekwencji praktycznych. Podejście tego typu (dokowanie molekularne) było kontynuowane również w przypadku badania wpływu ligandów receptora TRPV1 na receptory estrogenowe bisfenolu A. W efekcie doktorant wykazał, iż najbardziej szkodliwym metabolitem degradacji tego układu był 4-izopropylfenol, który najsilniej oddziałuje z receptorem  $ERR\gamma$  ludzkim i  $ERR\gamma B$  rybim. Toksyczność związków potwierdzona była w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem zarodków *Danio rerio*. Choć również i te badania powinny być kontynuowane w przyszłości, wskazują na duży obszar metodologiczny, którym dysponuje doktorant jak również na jego kreatywność.

Rozprawa doktorska przygotowana została niezwykle starannie i to zarówno pod względem edytorskim, jak i graficznym, co wystawia bardzo dobre świadectwo osobowości doktoranta. Dodatkowo przedstawione analizy, choć z dużą ilością szczegółów są opisane bardzo dobrym, choć jak na wstępie zazaczyłem, zwięzłym językiem naukowym. Zwyczajowo recenzenci w swych recenzjach starają się znaleźć w tekście drobne niezręczności. Takich w pracy jest jednak bardzo niewiele i w najmniejszym stopniu nie umniejszają one wysokiej wartości recenzowanej przeze mnie dysertacji. Na stronie 20 niepotrzebnie pojawiają się spacje w nazwie związku ((6-E)-N-[(4-hydroksy-3-metoksyfenylo)metylo]-8-metylo-6-nonenamid)), na stronie 30 brak jest spacji pomiędzy „w” i „biotransformacji” zaś na 129 jest literówka w nazwie związku chemicznego (4-

izopropylofenolu). Ponadto wielokrotnie cytując prace wcześniejsze pojawiają się odnośniki do prac (najczęściej przeglądowych) opublikowanych współcześnie (np. odnośnik [1] na stronie 9 dotyczy pracy z roku 2012 a w teście odnosi się do roku 1900. Podobnie jest w przypadku odnośników [2] i [4] na stronie 10, odnośnika [5] na stronie 18, [52] i [53] na stronie 25 etc. Brakowało mi również rysunku homokapsaicyny o której pisze doktorant na stronie 24.

Na uwagę i wyróżnienie zasługuje fakt, iż doktorant jest autorem kilku prac naukowych opublikowanych w notowanych pismach o cyrkulacji międzynarodowej takich jak *Journal of Molecular Structure* czy *Zebrafish*. Wyniki swoich badań publikował również w czasopiśmie krajowym – m.in. w *Farmacji Polskiej*, *Farmacji współczesnej*, *Lek w Polsce*, *Postępy fitoterapii i innych*. Łącznie prac jest 11 (+ 3 w recenzjach).

**Reasumując:** Stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr. Pawła Michała Siudema zawiera istotne elementy nowości naukowej. Doktorant wykazał się dużą biegłością w zakresie prezentowanej tematyki przedmiotu, w szczególności doskonałością warsztatu badawczego z zakresu spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego. W swych badaniach posiłkował się również innymi metodami, takimi jak zaawansowane metody obliczeniowe chemii teoretycznej, metoda dyfrakcji promieni rentgenowskich na materiale proszkowym, wykonywał również badania biologiczne. Analiza wyników jak również ich prezentacja, w mojej ocenie jest wzorowa, co dowodzi jego dojrzałości naukowej. Uważam, że uzyskane przez niego wyniki są cenne i stanowią znaczący wkład w rozwój chemii/biochemii/farmacji w szczególności w kontekście projektowania i analizowania substancji farmaceutycznie czynnych. Więcej, są one inspirujące do podjęcia dalszych badań, czego wyrazem jest szereg uwag przedstawionych powyżej. Staranność z jaką została przygotowana rozprawa wystawia jednoznacznie pozytywne świadectwo dla osobowości Jej Autora.

**Jestem całkowicie przekonany, iż praca doktorska mgr. Pawła Michała Siudema spełnia wszelkie warunki formalne stawiane przez obowiązującą ustawę o stopniach i tytułach naukowych i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na obszerność przeprowadzonych analiz oraz dojrzałość naukową i kreatywność doktoranta wnoszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy doktorskiej.**



Michał K. Cyrański