

*Prof. Marek Wesółowski*  
*Katedra i Zakład Chemii Analitycznej*  
*Gdański Uniwersytet Medyczny*

## **Recenzja**

**pracy doktorskiej mgra farm. Pawła Michała Siudema pt.:**  
***Analiza strukturalna i fizykochemiczna wybranych ligandów receptora TRPV1,***  
**wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. farm. Katarzyny Paradowskiej**  
**w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Farmacji Fizycznej i Bioanalizy,**  
**Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Praca doktorska mgra Pawła M. Siudema nawiązuje do długiej tradycji stosowania w leczeniu roślinnych surowców leczniczych. Zainteresowanie roślinami jako potencjalnymi lekami sięga czasów od starożytności aż do XIX w., kiedy to rozwój nauk chemicznych, a w szczególności poznanie złożonych mechanizmów syntezy organicznej doprowadził do masowej produkcji syntetycznych substancji leczniczych i częściowej eliminacji substancji pochodzenia roślinnego. Stosunkowo szybko okazało się jednak, że działanie związków syntetycznych jest szybsze, ale działanie ich odpowiedników roślinnych jest skuteczne, długotrwałe i z zasady pozbawione niepożądanych skutków ubocznych. Między innymi z tego powodu obserwuje się duże zainteresowanie powrotem do leku roślinnego, na co wskazują liczne badania naukowe zmierzające w kierunku poznania struktury chemicznej, właściwości fizycznych i chemicznych oraz aktywności i biologicznej licznych metabolitów wtórnych produkowanych przez rośliny, z reguły w odpowiedzi na stres, infekcje, uszkodzenia mechaniczne lub niekorzystny wpływ promieniowania ultrafioletowego.

Z tego krótkiego wprowadzenia wynika, że prowadząc badania związane z poznaniem struktury chemicznej (konformacji) związków pochodzenia roślinnego i prawdopodobnego mechanizmu ich działania biologicznego oraz analizą produktów handlowych zawierających te substancje, mgr Paweł M. Siudem włączył się w cykl badań szczególnie wartościowych z farmaceutycznego punktu widzenia, mogących skutkować w przyszłości wprowadzeniem do leczenia nowych produktów farmaceutycznych o szerokim wachlarzu zastosowań w różnych jednostkach chorobowych. Ponadto, z uwagi na fakt, że badania prowadzone przez dobrego specjalistę z użyciem wysoce specjalistycznych technik instrumentalnych, jak spektroskopia

NMR w ciele stałym i dyfrakcja rentgenowska oraz wspomagane zaawansowanymi technikami obliczeniowymi mogą doprowadzić do uzyskania wartościowych i wiarygodnych rezultatów, podjęcie przez Doktoranta badań nad wybranymi ligandami receptora TRPV1 uważam za wielce pożądane.

Dokonując formalnej oceny rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, iż została ona przedstawiona w formie monografii liczącej 155. numerowanych stron i składa się z dziewięciu rozdziałów. Integralnym elementem dysertacji jest strona tytułowa, podziękowania, w tym podziękowanie dla Pani Promotor, dr hab. Katarzyny Paradowskiej oraz szczegółowy spis treści. Pięć najważniejszych z merytorycznego punktu widzenia rozdziałów to *Wstęp i cele pracy*, *Część literaturowa*, *Część eksperymentalna*, *Wyniki i dyskusja* oraz *Wnioski*. Całości dopełnia zestaw piśmiennictwa wykorzystanego w pracy i zestawionego w rozdziale *Literatura*, a ponadto spis skrótów oraz tytułów 73. ilustracji i 27. tabel.

Ostatnia strona dysertacji doktorskiej obejmuje listę publikacji mgra Pawła M. Siudema z podziałem na artykuły związane z tematyką doktoratu i pozostałe prace. Spośród artykułów pierwszej grupy, dwa zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), natomiast trzeci artykuł jest w toku procesu recenzyjnego. Fakt publikacji wyników badań będących tematem doktoratu w recenzowanych czasopismach o obiegu międzynarodowym, tj. w *Zebrafish* (2016, IF = 1,742) i *Journal of Molecular Structure* (2017, IF = 2.120) świadczy o wysokim poziomie naukowym tych prac, poprawności merytorycznej i zainteresowaniu tematyką. Wobec wartościowego dorobku publikacyjnego, zadanie Recenzenta staje się więc swego rodzaju formalnością. Ponadto, mgr P.M. Siudem jest autorem kolejnej pracy z użyciem spektroskopii NMR w ciele stałym (*Journal of Molecular Structure*, 2019) oraz licznych artykułów poglądowych.

Zasadniczą część pracy doktorskiej poprzedza krótki rozdział, *Wstęp i cele pracy*. W zwięzły sposób Doktorant przybliżył w nim problematykę podjętą w doktoracie i związane z tym cele badań. Wynika z nich, iż zasadniczym celem pracy są badania strukturalne (analiza konformacyjna) w fazie stałej znanych związków pochodzenia roślinnego, odznaczających się aktywnością biologiczną. Wspólnym elementem łączącym badane związki, tj. kapsaicynę, jej dwie pochodne – dihydrokapsaicynę i noniwamid oraz kurkuminę i piperynę, jest receptor TRPV1, z którym mogą oddziaływać. Z uwagi na fakt, iż badane substancje są dobrze znanymi składnikami popularnych przypraw i suplementów diety, drugim celem podjętym przez mgra P.M. Siudema były badania analityczne suplementów diety z kurkuminą pod kątem rutynowej kontroli jakości tych produktów. Problematykę badawczą dopełnia cel trzeci, który obejmuje

szereg aspektów badań biologicznych tytułowych substancji i bisfenolu A, jedyne ujęte w doktoracie związku syntetycznego, który może wpływać na receptor TRPV1, stosując metody teoretyczne (dokowanie molekularne).

Zagadnienia teoretyczne związane z realizacją podstawowych celów badań Doktorant scharakteryzował w liczącym ponad 40. stron rozdziale *Część literaturowa*. Wskazał w nim na dwa podstawowe elementy uzasadniające cele badań. Po pierwsze, zwrócił uwagę na fakt, iż bez wcześniejszego poznania receptorów i szlaków biochemicznych nie jest możliwe poznanie mechanizmu działania biologicznego danego związku chemicznego. Kolejny element związany jest z faktem, iż właściwości fizykochemiczne związków chemicznych w fazie stałej różnią się istotnie od właściwości ich roztworów, wpływając bezpośrednio na biodostępność i efekt terapeutyczny. Oba te elementy zdecydowały o wyborze określonych związków chemicznych i narzędzi do ich badania.

W dalszej części rozdziału *Część literaturowa*, mgr P.M. Siudem w sposób zrozumiały przedstawił szeroko charakterystykę receptora TRPV1, określanego również jako receptor kapsaicyny, wraz ze wskazaniem podstawowych elementów struktury, które powinien posiadać ligand aby mógł oddziaływać z tym receptorem. Podstawowy element tej struktury to układ amidowy lub estrowy, zdolny do tworzenia wiązań wodorowych w miejscu aktywnym. Tymi ugrupowaniami odznaczają się wszystkie badane związki, tj. kapsaicyna i jej pochodne, kurkumina, piperyna i bisfenol A, a ich wyczerpującą charakterystykę przedstawiono na kolejnych 15. stronach tekstu.

Istotnym elementem rozprawy doktorskiej jest też charakterystyka metod badawczych. Uwagę zwraca zwięźle wprowadzenie teoretyczne do spektroskopii NMR, uwzględniające specyfikę pomiarów zarówno w roztworze, jak i w ciele stałym. Ponieważ badania skupiały się głównie na pomiarach widm NMR w ciele stałym, Doktorant przybliżył specjalną technikę pomiaru określaną akronimem MAS (*Magic Angle Spinning*), polegającą na wirowaniu próbki pod „kątem magicznym”, która przeciwdziała zaburzeniom zewnętrznego pola magnetycznego prowadząc do uzyskania wąskich sygnałów w widmie NMR. Doktorant scharakteryzował też zjawisko polaryzacji skrośnej CP (*Cross Polarization*), polegające na transferze magnetyzacji od protonów do jąder atomów węgla, skutkujące polepszeniem intensywności sygnałów atomów węgla. Zwrócił też uwagę na eksperyment z filtrem dipolowym, który umożliwia wybiórczą obserwację czwartorzędowych atomów węgla.

Bardzo dobrze opracowaną część teoretyczną i wskazującą na dogłębne poznanie przez Doktoranta zagadnień, jakimi będzie się zajmował podczas wykonywania pracy doktorskiej,

kończy krótki opis proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (PXRD) oraz wprowadzenie do metod obliczeniowych, algorytmu ewolucyjnego, dokowania molekularnego i testu toksyczności na zarodkach *Danio rerio*.

Zakres prac eksperymentalnych związany z realizacją celów badań wraz z uzyskanymi wynikami, dyskusją oraz wnioskami, Doktorant przedstawił w dwóch kolejnych rozdziałach *Wyniki i dyskusja* oraz *Wnioski*. W szczegółowym ujęciu plan prac obejmował badania NMR w roztworze i ciele stałym kapsaicyny, dihydrokapsaicyny, noniwamidu, kurkuminy i piperyny, wspomagane odpowiednimi technikami obliczeniowymi opartymi na różnych funkcjonalach, których zadaniem było obliczenie teoretycznych parametrów sygnałów NMR oraz badanie geometrii w/w związków. Doktorant dążył do wykonania obliczeń nie tylko dla izolowanych cząsteczek, ale także uwzględniając periodyczność układu, jednak z uwagi na brak danych o strukturze krystalicznej, nawet z PXRD, nie udało się tych obliczeń wykonać w przypadku dihydrokapsaicyny i noniwamidu. W tej sytuacji, do opisu struktury badanych cząsteczek w fazie stałej pomocny był algorytm ewolucyjny, który umożliwiał przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej. Ponadto, badając kinetykę polaryzacji skrośnej kapsaicynoidów z użyciem różnych czasów kontaktu, Doktorant uzyskał dodatkowe informacje o strukturze związków w fazie stałej, w tym rozróżnienie IV rzędowych atomów węgla. Badając kurkuminę i piperynę wykonał również obliczenia dla układów periodycznych aby ustalić, która forma polimorficzna była obecna w próbce. Pomiarami  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR objęto także suplementy diety próbując ustalić pochodzenie kurkuminy zawartej w tych produktach.

Zrealizowany przez mgra P.M. Siudema szeroki zakres badań eksperymentalnych oraz towarzyszących im zaawansowanych obliczeń dokonanych przy użyciu specjalistycznych programów i korzystając z różnych baz danych, doprowadził do opracowania nie budzących wątpliwości wniosków. Doktorant zapewnił wiarygodne dane na temat konformacji kapsaicyny w fazie stałej wskazując, że ma ona kształt „zgiętego” łańcucha alifatycznego skierowanego w stronę grupy metoksylowej, natomiast w roztworze odznacza się „wyprostowanym” łańcuchem. Z kolei pochodna kapsaicyny, dihydrokapsaicyna, ma również łańcuch alifatyczny „zgięty”, ale w kierunku przeciwnym niż kapsaicyna, podczas gdy noniwamid występuje w fazie stałej w formie dwóch konformerów, „wyprostowanego” i „zgiętego”. W przypadku obu pochodnych nie stwierdzono również międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Równie wartościowe i wiarygodne są pozostałe wnioski opracowane przez Doktoranta, dotyczące badań analitycznych produktów handlowych z kurkuminą oraz badań biologicznych.

Podsumowując obszerny i budzący zaufanie materiał faktograficzny dokumentujący

wyniki zrealizowanych badań oraz opracowane na ich podstawie logiczne i zwięzłe wnioski mogą z pełnym przekonaniem stwierdzić, że skonstruowany przez Doktoranta, pod kierunkiem Pani Promotor, dr hab. Katarzyny Paradowskiej, warsztat badawczy nie budzi zastrzeżeń. W mojej opinii, wszystkie prace zostały dobrze zaplanowane, poprawnie wykonane i właściwie zinterpretowane. Oceniana rozprawa świadczy więc o bardzo dobrym, ogólnym przygotowaniu mgra P.M. Siudema do realizacji badań z użyciem wysoce specjalistycznej aparatury, jaką jest spektrometr NMR do rejestrowania widm w ciele stałym. Wskazuje również na dużą wiedzę teoretyczną połączoną z umiejętnością korzystania ze specjalistycznego oprogramowania komputerowego niezbędnego do obróbki danych NMR. Doktorant opanował też w dużym stopniu umiejętność krytycznej oceny uzyskanych danych pomiarowych. Nie dziwi więc fakt, że jako jeden z pierwszych, nie tylko w Polsce, przeprowadził zaawansowane badania CP MAS NMR w połączeniu z metodami teoretycznymi, prowadzące do określenia konformacji w fazie stałej związków aktywnych biologicznie.

*Literatura* stanowi ostatni, IX rozdział rozprawy doktorskiej, obejmuje 133 pozycje bibliograficzne z pełnymi tytułami cytowanych artykułów i pełnymi tytułami czasopism, w których artykuły zostały opublikowane. Piśmiennictwo zostało dobrze wyselekcjonowane, odnosi się ściśle do problematyki poruszanej w doktoracie, a ponadto odznacza się dużym stopniem aktualności, ponad 60 % cytowanych prac (81 pozycji) zostało opublikowanych w okresie ostatnich dziesięciu lat (2010-2020), w tym 39 artykułów (prawie 30 %) opublikowano w ostatnich pięciu latach. Uwagę zwraca najstarsza cytowana praca, opublikowana w 1919 r., traktująca o strukturze chemicznej kapsaicyny, która pomimo upływu 100 lat nie została w pełni wyjaśniona i jest nadal tematem prac naukowych z użyciem wysoce specjalistycznych narzędzi badawczych. O wartość zebranego piśmiennictwa świadczy również jego użyteczność podczas dyskusji wyników badań. Tym samym literatura rozprawy doktorskiej przekonuje, że przed podjęciem badań Doktorant należycie rozpoznał problematykę, jaką będzie się zajmował w pracy badawczej. Potwierdza także dobre przygotowanie teoretyczne dra P. M. Siudema do prowadzenia zaawansowanych prac naukowych z wykorzystaniem spektroskopii NMR w ciele stałym wspomaganą użyciem stosownych metod obliczeniowych, które warunkują poprawną interpretację wyników badań.

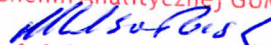
Należy podkreślić, że mimo trudnej i złożonej problematyki badawczej, pod względem redakcyjnym praca doktorska została opracowana bardzo starannie. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a rozmieszczenie tabel i rysunków prawidłowe. W wielu przypadkach schematy, a także struktury badanych związków zostały zilustrowane w formie profesjonalnie wykonanych

kolorowych rycin. Jednak pomimo starannej korekty, napotkać można nieliczne niefortunne zwroty oraz drobne błędy edytorskie. Z obowiązku Recenzenta, wymienię kilka z nich. Na stronie 95, w wierszu 11, zamiast "Tetramer z ... wiązaniami wodorowymi został uzyskano w wyniku" powinno być "Tetramer z ... wiązaniami wodorowymi uzyskano w wyniku". Na stronie 123, w wierszu 6 od dołu, zamiast „wykazałem, że jest kapsaicyna może być” powinno być „wykazałem, że kapsaicyna może być”. Z kolei na stronie 73, stała czasowa zilustrowana została za pomocą symbolu czasu relaksacji. Ponadto, wielokrotnie, energia podawana jest w kcal/mol zamiast w jednostkach układu SI, tj. w kJ/mol, natomiast wartości liczbowe nie są oddzielane spacją od jednostki, np. 0,005mg/L zamiast 0,005 mg/L. Te redakcyjne usterki nie są jednak istotne dla ogólnej oceny strony merytorycznej i redakcyjnej pracy.

W świetle wyżej przedstawionej, wysokiej oceny rozprawy autorstwa mgra farm. Pawła Michała Siudema pt.: *Analiza strukturalna i fizykochemiczna wybranych ligandów receptora TRPV1*, stwierdzam, że odpowiada ona ustawowym, w świetle ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65 poz. 595, z późn. zm.), a także wydanych a jej podstawie rozporządzeń, warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wnioski o dopuszczenie mgra Pawła M. Siudema do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wkład pracy wniesiony przez Doktoranta w trakcie konsekwentnej realizacji celu badań, innowacyjny charakter podjętej problematyki i opublikowanie znacznej części wyników w czasopiśmie o wysokiej renomie naukowej, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra farm. Pawła M. Siudema.

Gdańsk, dnia 16 kwietnia 2020 r.

K I E R O W N I K  
Katedry i Zakładu  
Chemii Analitycznej GUMed  
  
prof. dr hab. Marek Wesółowski