

Łódź, dnia 2015-11-25

Prof. dr hab. Aleksander Kufelnicki

Profesor nadzwyczajny

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Marzeny Symonowicz pt. „Właściwości fizykochemiczne i biologiczne chelatowych połączeń metali przejściowych z wybranymi flawonoidami i ich analogami”, Łódź 2015, 160 stron, tabele, wykresy i rysunki, 294 pozycje literaturowe. Praca wykonana w Instytucie Podstaw Chemii Żywności Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Elżbiety Łodygi-Chruścińskiej.

Oddziaływanie jonów biometali ze związkami występującymi w roślinach i organizmach żywych wzbudza zainteresowanie naukowców od wielu lat. Spośród biometali Autorka słusznie wybrała miedź (II) należącą do grupy metali przejściowych – mikroelement, który jest po żelazie najbardziej istotnym biometalem w organizmach żywych. Miedź występuje m.in. w centrach aktywnych enzymów, bierze udział w przesyłaniu sygnałów nerwowych, wchodzi w skład jednego z pigmentów oddechowych - hemocyjaniny. Wiadomo, że zachwianie homeostazy miedzi może prowadzić do silnych zaburzeń organizmu. Z kolei, jej kompleksy donorowo-akceptorowe, a zwłaszcza kompleksy chelatowe, często wykazują większą aktywność biologiczną niż wolne związki występujące w przyrodzie.

Objektami biologicznymi, które były przedmiotem wszechstronnych badań w niniejszej pracy są dwa związki pochodzenia roślinnego z grupy flawonoidów: fizetyna, występująca głównie w truskawkach oraz innych owocach i warzywach oraz hesperetyna, występująca

głównie w owocach cytrusowych i kwiatach. Są to związki wykazujące szereg działań leczniczych i zapobiegawczych w organizmie człowieka, jak wykazują najnowsze badania ostatnich lat. W przypadku hesperetyny Autorka poddała analizie otrzymaną przez siebie syntetyczną pochodną, a mianowicie hydrazonową zasadę Schiffa. Jest to posunięcie o tyle godne uznania, że w chemii biokoordynacyjnej zasady Schiffa są często używane jako ligandy chelatujące. Wykorzystuje się tu na przykład fakt, że zasady Schiffa ze swymi donorami azotowymi mają, dzięki obecności grupy iminowej, zdolności wpływania na reakcje zachodzące w naturalnych układach biologicznych.

Same flawonoidy są zresztą także interesującą grupą związków, zarówno z punktu widzenia chemii biokoordynacyjnej, jak i wykazywanej aktywności biologicznej. Flawonoidy jako wielozasadowe kwasy posiadają szereg form jonowych, w tym takie które mogą tworzyć połączenia chelatowe wraz ze wzrostem pH. Pierwsze kompleksy flawonoidów opisywane były już w połowie ubiegłego wieku, a literatura tego tematu jest bardzo obszerna aż do chwili obecnej. W wielu badaniach wykazano, że flawonoidy działają znacznie bardziej skutecznie jako przeciwutleniacze w chelatach z jonami metali niż jako wolne związki. Wiele uwagi poświęcono też oddziaływaniom tych kompleksów z biomolekułami, np. z DNA. Chciałbym w tym miejscu szczególnie docenić trud autorki w zebraniu prawie 300 pozycji piśmiennictwa ze znaczną przewagą pozycji współczesnych i, co warto podkreślić, w bardzo skrótowym, aczkolwiek właściwym przedstawieniu części teoretycznej.

Cele jakie postawiła sobie Autorka dotyczyły zbadania fizykochemicznych i biologicznych właściwości fizetyny, hesperetynowej zasady Schiffa oraz ich kompleksów z miedzią w roztworze. Część biologiczna dotyczyła właściwości antyoksydacyjnych fizetyny i jej kompleksów, oddziaływań z *CT* DNA, mechanizmu cięcia DNA plazmidowego, a także badań cytotoksyczności oraz aktywności przeciwbakteryjnej hesperetynowej zasady Schiffa i jej kompleksów z miedzią. Były to cele ambitne, ale praktycznie, dzięki zastosowaniu wielu metod

badawczych i bardzo starannym ich wykonaniu, w całości osiągnięte. Oprócz dokładnego określenia form jonowych badanych ligandów oraz ich form kompleksowych z miedzią (II) w roztworach mieszanych, wyznaczenia odpowiednich stałych tworzenia oraz pełnej charakterystyki spektroskopowej otrzymanych połączeń, Autorka wykazała, że kompleksy fizetyny z miedzią mają większą aktywność antyoksydacyjną, jak również silniejsze oddziaływanie z DNA w porównaniu z samym ligandem. Słuszne okazało się też zmodyfikowanie cząsteczki hesperytyny do postaci zasady Schiffa przez wprowadzenie grupy azometinowej. W rezultacie otrzymany związek chelatowy z miedzią wykazał wysoką reaktywność wobec DNA przy braku kofaktorów, co wskazuje na celowość dalszych badań aplikacyjnych w kierunku terapeutycznym, a także w kierunku innych zastosowań nie wymagających kofaktorów w aktywowaniu czynników rozcinających DNA. Podobna przewaga kompleksu HHSB z miedzią w stosunku do samego liganda wynika z badań *in vitro* aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej.

Tematyka niniejszej pracy doskonale koreluje z najnowszymi kierunkami badań nad flawonoidami i ich pochodnymi, w tym nad ich kompleksami z jonami metali. Zwraca też uwagę znaczący dorobek publikacyjny Autorki w zespole p. prof. dr hab. inż. Elżbiety Chruścińskiej.

Krótkie uwagi krytyczne i uwagi redakcyjne:

1. Struktura edytorska, a zwłaszcza korekta znaków oraz interpunkcja, nie są najmocniejszą stroną recenzowanej pracy, chociaż nie ma to istotnego wpływu na jej czytelność. Pewnym utrudnieniem jest jednak to, że niektóre rysunki lub wykresy są przedstawione w zbyt dużym zmniejszeniu, być może w celu oszczędności miejsca, ale utrudnia to ich analizę. Sądzę, że przy sporządzaniu manuskryptów do dalszych publikacji problem ten i tak będzie musiał być uwzględniony.

2. Uwagi ogólne związane z tytułami: mam wątpliwości wobec części tytułu pracy, gdzie mowa jest o „analogach wybranych flawonoidów”, a później na str. 11 takim analogiem nazywana jest hesperetynowa zasada Schiffa. Czy nie lepsze byłoby określenie „syntetyczne pochodne flawonoidów”? Na czym miałyby polegać analogia? Ponadto na str. 12 tytuł rozdziału 2.4. brzmi „Związki kompleksowe flawonoidów i ich analogów z jonami metali przejściowych”, podczas gdy dalej mowa jest tylko o flawonoidach.
3. W wykazie skrótów termin DFT jest wyjaśniony dwukrotnie; określenie współczynnik rozszczepienia elektronowego g wydaje mi się dość rzadkie i niejednoznaczne – w spektroskopii EPR stosowane jest raczej pojęcie współczynnik rozszczepienia spektroskopowego (spektralnego, zeemanowskiego, albo współczynnik magnetogiryczny, gyromagnetyczny).
4. Na str. 16 – „tetragonalnie odkształconego tetraedru” czy oktaedru?
5. Str. 28 – dlaczego zamiast obliczania wartości średnich z trzech miareczkowań nie łączono plików w celu wyznaczenia stałych trwałości? Wtedy otrzymanoby odchylenia standardowe. W programie SUPERQUAD można łączyć nawet do pięciu plików.
6. Str. 48 – czy chodzi o dekonwolucję widm na składowe Gaussa? Można się domyślać, ale brak odpowiedniego wyjaśnienia. Dekonwolucję można zresztą zrozumieć inaczej, np. rozkład wima na składowe związane ze specjacją uzyskaną potencjometrycznie na podstawie danego modelu równowag.
7. Str. 50 – ani w Tabeli 6, ani na wykresach specjacji nie ma mowy o hydrolizie akwajonu Cu(II). Czy nie brano pod uwagę tej reakcji ubocznej, skoro roztwór był w 50% wodny?
8. Str. 82 – wśród prostych regresji na Rysunkach 66, 67 są proste utworzone na podstawie trzech, czterech punktów, przez co odchylenia standardowe są bardzo znaczne, prawie tak duże jak same parametry. Wymagałoby to komentarza.

9. Str. 97 – co oznacza określenie pasmo CT w odniesieniu do samego liganda, w nieobecności jonu metalu?
10. Str. 100 – skoro siłę jonowa roztworów ustalano za pomocą KCl, to czy w miareczkowaniach z miedzią nie próbowano, choćby na podstawie danych literaturowych, określić udział kompleksów z anionami chlorkowymi, chociażby poprzez uwzględnienie tych równowag w modelu? Jest to znany problem chemii koordynacyjnej, ponieważ jony chlorkowe mają swój, aczkolwiek stosunkowo niewielki, udział w kompleksowaniu jonu metalu.
11. Na str. 128 użyto określenia „właściwości kompetencyjne fizetyny w wiązaniu jonów Cu(II)”. Czy chodzi o właściwości kompetycyjne?
12. Zastanawia niejednolitość sposobu cytowania piśmiennictwa, skądinąd niezwykle obszernego i starannie wybranego. Niektóre pozycje podawane są wraz z tytułami artykułów, inne nie.

Podkreślam, że powyższe uwagi nie odnoszą się do zasadniczej, merytorycznej wartości przedstawionej rozprawy, a dotyczą one tylko jej wybranych fragmentów lub bardzo szczegółowych zagadnień.

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marzeny Symonowicz zawiera istotne elementy nowości naukowej i obejmuje zagadnienia o dużej potencjalnej wartości aplikacyjnej w dziedzinie biotechnologii. Praca pod względem merytorycznym i formalnym całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się z uprzejmą prośbą do wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Marzeny Symonowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

