



Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny

prof. dr hab. inż. Elżbieta Wojaczyńska
Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław
tel. 71 320 2410
e-mail: elzbieta.wojaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 21 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Jakuba Cędrawskiego pt. „Wpływ mikrootoczenia na mechanizm antyoksydacyjnego działania izotiocyanianów”, wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Utlenianie to proces o kapitalnym znaczeniu jako źródło energii dla organizmów żywych (oddychanie komórkowe) i dla gospodarki (przede wszystkim spalanie paliw). Z drugiej strony, procesy przebiegające z udziałem tlenu prowadzą do degradacji wielu materiałów (dość wspomnieć korozję metali) oraz wielu niekorzystnych zmian w komórkach wywołanych przez reaktywne formy tlenu. Tym ostatnim zapobiegają naturalne mechanizmy ochronne, wspomagane przez dostarczane w diecie przeciwutleniacze, przede wszystkim witaminy C, E i A. Wśród wielu substancji naturalnych o rozpoznanym działaniu antyoksydacyjnym znajdują się występujące w roślinach kapustowatych izotiocyaniany, takie jak sulforafan, erucyna czy rafastyna, którym przypisuje się również aktywność przeciwnowotworową, na co jednak dotychczas brak uznanych dowodów pochodzących z badań klinicznych. I choć postulowany mechanizm działania przeciwutleniającego tych połączeń opiera się na aktywacji odpowiednich enzymów, a nie bezpośredniej reakcji z rodnikami tlenowymi, to podjęcie systematycznych badań nad zdolnością izocyjanianów do hamowania procesów autooksydacji uważam za celowe i wartościowe. Tym właśnie zagadnieniom poświęcona jest przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr. inż. Jakuba Cędrawskiego powstała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; jej promotorem jest prof. dr hab. Grzegorz Litwinienko.

Rozprawa ma postać monografii liczącej 155 stron, o zasadniczo tradycyjnym podziale treści na wstęp literaturowy, część eksperymentalną, prezentację wyników, ich dyskusję, wnioski końcowe oraz spis literatury. Czterdziestostronicowa część teoretyczna rozpoczyna się charakterystyką procesu autooksydacji, jego opisu kinetycznego i na tym tle przedstawienia mechanizmu działania antyoksydantów. W dalszej części Autor koncentruje uwagę czytelnika na grupie związków stanowiących przedmiot rozprawy – organicznych izotiocyanianach, ich występowaniu, syntezie oraz aktywności antyoksydacyjnej. Zarówno wybór problematyki

poruszanej w tym przeglądzie literaturowym, jak i dobór materiału źródłowego oraz sposób prezentacji świadczą o bardzo dobrej orientacji i biegłości mgr. inż. Jakuba Cędrawskiego w tej tematyce. Wstęp stanowi jednocześnie kompetentnie napisane i rzeczowe wprowadzenie do dalszej części rozprawy. Moje drobne zastrzeżenia dotyczą syntez opisanych na stronach 41 i 42. Można zauważyć, że metody opisane równaniami **35** i **37** są również stosowane do syntezy tiomoczników, istotna jest odpowiednia stechiometria i warunki reakcji. Równanie **36** jest niebilansowane, a wzór odczynnika Lawessona w reakcji **40** jest niepoprawny. Domyślam się, że bezpieczniejszą pochodną tiofosgeny miał być tritiofosgen, nie trifosgen (str. 41). Warto też odnotować fakt, że sulforafan i sulforafen są związkami chiralnymi i w naturze spotykana jest określona forma – enancjomer *R*, co nie jest widoczne na rysunku 1.14. Acetyloaminę z rysunku 1.15 można by nazwać po prostu amidem.

Część eksperymentalną rozpoczyna przedstawienie idei i planu badań opisywanych w rozprawie. To umiejscowienie jest dość zaskakujące, z reguły bowiem cel pracy stanowi odrębny fragment dysertacji. Samo przedstawienie hipotez badawczych i sposobów ich weryfikacji jest klarowne i racjonalne, a zamierzenia Autora jawią się jako możliwe do zrealizowania przy pomocy wymienionych technik eksperymentalnych. Następnie czytelnik zostaje zapoznany z opisem syntez, mgr inż. Jakub Cędrawski otrzymywał bowiem część badanych związków osobiście, na podstawie odpowiednio zmodyfikowanych procedur literaturowych. Uwagę zwraca duża selektywność w reakcji utleniania sulfidu **3a** – sulfotlenek i sulfon otrzymał Doktorant z wydajnościami $\geq 99\%$, bez konieczności chromatograficznego oczyszczania. Zabrakło mi informacji o środkach bezpieczeństwa, zwłaszcza w etapach, w których stosowany był tiofosgen. Być może w przyszłości jakiś niedoświadczony badacz będzie próbował powtórzyć syntezy opisane w pracy i dobrze byłoby zawrzeć w tekście odpowiednie ostrzeżenia.

Wszystkie związki zostały scharakteryzowane przy pomocy technik ^1H NMR i ^{13}C NMR; Autor wspomina także o spektrometrii mas, jednak dla związków **2-4** wyników nie podał. Dane spektralne dla finalnych produktów znalazły się pod odpowiednimi widmami w rozdziale 3.1. Część eksperymentalną kończy szczegółowy opis sposobu wykonania pomiarów kinetycznych oraz analizy uzyskanych wyników.

Pisząc wcześniej o „zasadniczo tradycyjnym” podziale treści miałam na myśli nie tylko umiejscowienie celu pracy, ale także zastosowane przez mgr. inż. Jakuba Cędrawskiego oddzielenie prezentacji uzyskanych wyników od ich omówienia. Niewątpliwie ma to pewne zalety, natomiast lektura rozdziału 3, ponad 40-stronicowego, zawierającego liczne podobne do siebie wykresy i tabele wymaga od czytelnika sporo cierpliwości i koncentracji. Zaczyna Autor od wspomnianej charakterystyki spektralnej badanych izotiocyanianów. Zamieszczone widma wskazują na wysoką czystość otrzymanych związków. Choć rozumiem intencje stojące za zaprezentowaniem widm w całym badanym zakresie, to w paru przypadkach aż się prosi, żeby dodatkowo pokazać poszerzony fragment zawierający kluczowe sygnały. Na kolejnych stronach umieścił Doktorant 23 tabele i 46 wykresów ilustrujących wyznaczenie parametrów kinetycznych dla reakcji między rodnikiem $\text{dpph}^\bullet$ z czterema badanymi antyoksydantami, prowadzonych w różnych rozpuszczalnikach, także w obecności jonów magnezowych. Badania te niewątpliwie wymagały dużej cierpliwości i systematyczności, każdą z ok. 300 wartości wyznaczonych wartości stałych k_{exp} znajdujących się w tabelach Autor zmierzył trzykrotnie. Skrupulatność przydatna była także podczas analizy wyników. Przy ich pobieżnym przeglądzie

daje się zauważyć, że kilka wykresów z wartością R^2 poniżej 95% wykazuje duży rozrzut wyników (3.4, 3.6, 3.8!, 3.15, 3.16...). W niektórych przypadkach stała szybkości wyznaczona w dwóch seriach wykazuje świetną zgodność, ale w innych różnica przekracza 30, a nawet 40% (Tabele 3.16, 3.17). Moim zdaniem, we wszystkich takich wątpliwych sytuacjach warto byłoby przeprowadzić jeszcze jedną serię pomiarów. Ponadto w Tabeli 3.1 jedno ze stężeń SFN zamiast 11,03 powinno mieć wartość 113,0 mM.

Kolejna seria pomiarów dotyczyła zmian szybkości autooksydacji kumenu w chlorobenzenie w obecności izotiocyjanianów (mierzony był ubytek tlenu w układzie). Prezentację wyników kończy określenie wpływu tych związków na trwałość trzech wybranych matryc lipidowych: kwasu linolenowego, lecytyny sojowej i oleju słonecznikowego w warunkach utleniających w podwyższonej temperaturze. Zastosowanie Skaningowej Kalorymetrii Różnicowej pozwoliło na wyznaczenie szeregu parametrów, m.in. stałych szybkości oraz energii aktywacji reakcji utleniania. Tym razem trudno mieć zastrzeżenia do zależności przedstawionych wykresami.

Omówienie wyników i wniosków z nich wynikających stanowią przedmiot rozdziału 4 dysertacji. Autor zestawiał w tabelach wartości stałych szybkości reakcji badanych przeciwutleniaczy z rodnikiem $\text{dpph}^\bullet$ w różnych rozpuszczalnikach (warto było podać temperaturę), co pozwoliło na powiązanie właściwości antyoksydacyjnych ze strukturą związku oraz określenie wpływu rozpuszczalnika na przebieg procesu. W przypadku reakcji w metanolu wprowadzenie do układu jonów magnezowych (w postaci $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ – czy badane były też inne sole?) generalnie powodowało wzrost szybkości. Na podstawie danych eksperymentalnych i wspierając się obliczeniami DFT Autor zaproponował możliwy mechanizm procesu. Pytanie, jakie nasunęło mi się podczas lektury tego fragmentu, brzmi: jaką konfigurację przyjęto dla sulforafanu w tej analizie? Może mieć ona wpływ na energię odpowiedniego kationorodnika o budowie pseudocyklicznej.

Do interesujących wniosków prowadziły badania autooksydacji kumenu w obecności izotiocyjanianów, które w niskich stężeniach nie tylko nie hamowały tego procesu, ale wręcz przyspieszały spadek stężenia tlenu w układzie. Działanie inhibujące pojawiało się dla wyższych stężeń, ale kinetyka nie była zgodna z oczekiwaną dla skutecznych antyoksydantów interwencyjnych. Również badania techniką DSC wykazały, że efektywność działania badanych izotiocyjanianów jest ograniczona i tylko w zakresie temperatury 100-150 °C obserwowany był spadek szybkości autooksydacji oleju słonecznikowego i lecytyny sojowej. Jako możliwy mechanizm działania izotiocyjanianów mgr inż. Jakub Cędrowski rozważył ich rozkład w tych warunkach z przekształceniem ERN i SFN do odpowiednich kwasów sulfenowych i posługując się techniką GC-MS zidentyfikował trzy produkty takiej degradacji. Tę część uważam za szczególnie interesującą; szkoda, że w badaniach nie został użyty odpowiedni sulfon (ERS) albo analog z grupą karbonylową (2-oxoHITC), ich brak działania inhibującego stanowiłby dodatkowy dowód na to, że grupa sulfinyłowa (lub tioeterowa mogąca się do niej utlenić) jest niezbędnym elementem strukturalnym. Wątpliwości pozostają – przywołane na stronach 130-131 dane literaturowe sugerują, że eliminacja Cope'a obserwowana była już w temperaturze 50-60 °C, w której ERN i SFN nie wykazywały zdolności do hamowania autooksydacji matryc lipidowych. Niestety w pracy brak informacji o ewentualnych badaniach degradacji termicznej obu związków w tej temperaturze, czy było

to sprawdzane? I jeszcze jedna uwaga: na stronie 133 czytamy, że metanotiosulfonian metylu utleniany jest do końcowego produktu – zapewne chodziło o metanotiosulfinian.

W podsumowaniu mgr inż. Jakub Cędrawski wymienia w punktach najważniejsze osiągnięcia pracy, opatrując je krótkimi komentarzami. Wynika z nich, że postawione cele zostały osiągnięte i Autor uzyskał szereg nowych informacji dotyczących działania antyoksydacyjnego sulforafanu i jego analogów. Uzyskane rezultaty wskazują na ich zdolność izotiocyjanianów do przerywania łańcucha kinetycznego autooksydacji, jednak ich efektywność jest ograniczona, co wydaje się wzmacniać twierdzenia o ich niebezpośrednim działaniu w układach biologicznych (co jednak nie było przedmiotem pracy).

Spis cytowanej literatury zawiera 228 pozycji i jest bardzo starannie przygotowany, co warto podkreślić, bo stosunkowo rzadko w rozprawach doktorskich udaje się zachować chociażby jednolity format odnośników.

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, wolnym od wyrażen slangowych. Redakcja tekstu jest staranna, bardzo niewiele jest literówek i innych błędów zapisu. Nieliczne są sformułowania, które budzą wątpliwości, np. łącznik $-(CH_2)_n-$ można nazwać metylenowym jedynie dla $n = 1$, ogólną nazwą jest oligo- lub polimetylenowy (str. 113). Na stronie 125 czytamy: „W temperaturze T_{iso} szybkości tych reakcji są sobie równe.”, jednak nie wiadomo, jakie reakcje są porównywane. Ponadto Doktorant podaje część wartości energii, np. dysocjacji wiązania, w kilokaloriach na mol, ale energie aktywacji już w kilodżulach na mol. Warto było to ujednolicić. Jeśli miałabym wskazać słabą stronę pracy, dziedzinę, w której Autor nie porusza się tak sprawnie, jak w innych – byłaby to interpunkcja. Brak przecinków w wielu zdaniach złożonych, w tym łączonych zaimkiem „który”, powinien przecież zostać wyłapany przez program sprawdzający pisownię. To oczywiście bardzo nie utrudnia lektury treści, ale niechęć do używania jednego z podstawowych znaków interpunkcyjnych jest zastanawiająca. Tekst dopełniają odpowiednie rysunki, wykresy, schematy przedstawiające związki i ich przekształcenia, czytelne i starannie przygotowane, z rozsądnym wykorzystaniem koloru.

Tekst pracy doktorskiej wskazuje, że mgr inż. Jakub Cędrawski posiadał znaczną wiedzę teoretyczną i praktyczną z zakresu fizycznej chemii organicznej, a w szczególności badań kinetycznych procesów autooksydacji. Uzyskane przez niego wyniki przyczyniły się w istotny sposób do poszerzenia i uporządkowania wiedzy na temat możliwego działania przeciwutleniającego sulforafanu oraz jego analogów. Warta podkreślenia jest staranność i biegłość Doktoranta w planowaniu eksperymentów, ich realizacji, a następnie szczegółowej analizy z wykorzystaniem zaawansowanych modeli matematycznych. Choć nie było to głównym tematem dysertacji, chciałabym docenić fakt, że pan Cędrawski przeprowadził część syntez opisywanych związków, a także je scharakteryzował, co świadczy o opanowaniu również technik preparatywnej chemii organicznej oraz podstawowych metod fizykochemicznych.

Wyniki badań opisanych w rozprawie znalazły się w dwóch artykułach (w czasopismach *Antioxidants* i *Food Chemistry*) oraz rozdziale w książce, która ukazała się w wydawnictwie Springer. Mgr inż. Jakub Cędrawski jest ponadto współautorem siedmiu innych publikacji w renomowanych czasopismach oraz jeszcze jednego rozdziału. Jest to dorobek znaczący, choć nie bez znaczenia jest fakt, że osiągnięty został w ciągu 11 lat (2012-2023). Ma też na swoim koncie liczne wystąpienia konferencyjne. W latach 2014-2015 odbył staże na Wydziale Chemii Uniwersytetu Bolońskiego w grupie prof. Ricardo Amaratiego.

Angażował się w zdobywanie środków na badania: kierował grantem NCN Preludium oraz wewnętrznym grantem Wydziału Chemii UW, był także wykonawcą w grantie NCN OPUS.

Podsumowując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa wypełnia zarówno zwyczajowe, jak i określone odpowiednimi przepisami wymagania stawiane pracom doktorskim. Stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. inż. Jakuba Cędrońskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "E. Wójcieszyn". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping horizontal stroke at the end.