Dr hab. Jarosław Sączewski
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk,
tel. 58-349-16-48, e-mail: js@gumed.edu.pl

Gdańsk, 24. 04. 2022 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Justyny Popiół pt. „Badania nad nowymi związkami o aktywności fotoprotekcyjnej w grupach pochodnych ksantonu i arylidenohydantoiny".

Wartość światowego rynku fotoprotekcyjnych produktów kosmetycznych szacowana jest na niemal 10 bilionów dolarów. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są eksperymentalne badania fizykochemiczne, biologiczne i aplikacyjne trzydziestu związków celem wykorzystania ich jako aktywne składniki formulacji kosmetycznych o działaniu promieniochronnym. W aspekcie syntezy chemicznej Pani mgr Justyna Popiół otrzymała siedemnaście cynamoilowych pochodnych ksantonu oraz trzynaście związków opartych o szkielet benzylidenohydantoiny. Pierwszy typ związków uzyskano w jednoetapowym procesie estryfikacji bromoalkilowych pochodnych kasantonu z odpowiednimi kwasami cynamiolowymi prowadzonym w dimetyloformamidzie wobec węglanu potasu. Należy zaznaczyć, że substraty ksantonowe zostały otrzymane przez Pana prof. dr hab. Henryka Maronę według uprzednio opracowanych procedur. Drugi rodzaj związków otrzymano wykorzystując kondensację Knoevenagla komercyjnych pochodnych benzaldehydu lub aldehydu (*E*)-cynamonowego z hydantoiną w środowisku kwasu octowego wobec octanu sodu, a następnie proces *N*-alkilowania za pomocą chlorooctanu etylu. W tym przypadku trzeba wspomnieć, że pięć z uzyskanych związków zostało wcześniej zarejestrowane w bazie *Chemical Abstracts*. Ewentualny zarzut wtórności podjętych wątków syntetycznych, poparty także dość oczywistą obserwacją Autorki o wyższej reaktywności bromooctanu w porównaniu z chlorooctanem, traci na znaczeniu w konfrontacji z mnogością badań przeprowadzonych z wykorzystaniem uzyskanych połączeń chemicznych.

Pani mgr Justyna Popiół jest absolwentką studiów licencjackich i magisterskich na kierunkach kosmetologia, odpowiednio Wydziału Humanistyki i Zdrowia Małopolskiej Wyższej

Szkoły im. Józefa Dietla w Krakowie oraz Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest kontynuacją tematyki podjętej podczas realizacji pracy magisterskiej „Dobór warunków analizy HPLC wybranych substancji promieniochronnych", gdzie opiekunem naukowym była Pani dr Dorota Żelaszczyk z Zakładu Chemii Bioorganicznej. Tekst rozprawy obejmuje łącznie 156 stron maszynopisu, z których 30 zawiera dość wyczerpujące wprowadzenie w podjęty temat badawczy, tj. przedstawienie najczęściej stosowanych substancji aktywnych produktów ochrony przeciwsłonecznej wraz z omówieniem podstaw fizycznych warunkujących ich działanie, fotostabilność, fototoksyczność i bezpieczeństwo stosowania. Na kolejnych 6 stronach Autorka przedstawiła założenia i cel pracy. Przesłanką do podjęcia badań w grupie pochodnych ksantonu było fotoprotekcyjne działanie C-piranozylowej pochodnej polifenolu, tj. mangiferyny, izolowanej z Mango indyjskiego (*Mangifera indica* L.). Nie bez znaczenia w aspekcie podjętego tematu badawczego było także doświadczenie pracowników Zakładu Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM w syntezie hydroksylowych, sulfhydrylowych i hydroksyalkoksylowych pochodnych ksantonu, co umożliwiło wprowadzenie grup auksochromowych oraz modyfikacje właściwości fizykochemicznych tego układu. Chromoforem, któremu poświęcono najwięcej uwagi był podstawnik (*E*)-cynamoilowy, który stosowany jest w produktach kosmetycznych, gdzie warunkuje działanie fotoprotekcyjne i antyoksydacyjne. Założono, że podstawienie pierścienia heterocyklicznego ksantonu grupą (*E*)-cynamoilową pozwoli na otrzymanie cząsteczek o szerokim spektrum działania fotoprotekcyjnego oraz zmniejszy ryzyko wchłania uzyskanych połączeń przez skórę. Natomiast asumptem do poszukiwań substancji promieniochronnych wśród pochodnych 5-arylidenohydantoiny była 3-benzylidenokamfora, która skutecznie pochłania promieniowanie ultrafioletowe, jednak z powodu nieodpowiedniego profilu bezpieczeństwa nie jest już wykorzystywana w przemyśle kosmetycznym. Założono, że wymiana ugrupowania kamfory na imidazolidyno-2,4-dion (hydantoinę) zaowocuje bezpiecznym produktem o wysokiej skuteczności działania promieniochronnego. Strukturę i czystość zaplanowanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Dalsza charakteryzacja fizykochemiczna produktów obejmowała oznaczenie temperatur topnienia oraz ocenę lipofilowości metodą chromatografii cienkowarstwowej w układzie faz odwróconych i z zastosowaniem modelu teoretycznego logP (miLogP) dostępnego on-line (platforma Molinspiration), a wybrane (dwa) związki scharakteryzowano za zastosowaniem analizy krystalograficznej. Najważniejszym etapem zaplanowanych badań było wykonanie widm absorpcji promieniowania ultrafioletowego dla wszystkich otrzymanych związków oraz porównanie wyników z danymi uzyskanymi dla znanych filtrów UV, tj. 4-metylobenzylidenokamfory, oktokrylenu, oktinoksatu i awobenzonu. Naturalnym rozwinięciem tych badań była ocena skuteczności działania fotoprotekcyjnego wyselekcjonowanych związków z zastosowaniem analizatora SPF-290AS, który został zaprojektowany i zoptymalizowany do oceny właściwości fotoprotekcyjnych produktów zgodnie z europejską normą EN ISO 24443:2012. Etap ten wymagał opracowania półstałych formulacji, czyli

zbadania rozpuszczalności w surowcach stosowanych w produktach kosmetycznych. Uzupełnieniem tego wątku były badania fotostabilności z wykorzystaniem symulatora światła słonecznego. W końcu bezpieczeństwo wybranych związków oszacowano w oparciu o ocenę cytotoksyczności, aktywności estrogennej i mutagennej, oraz stabilności metabolicznej, a dla najbardziej obiecującego związku działanie drażniące oraz przenikalność oceniono z wykorzystaniem modelu zrekonstruowanego ludzkiego naskórka (EpiSkin™). W tym miejscu należy podkreślić, że wykonanie takiej ilości specjalistycznych badań nie byłoby możliwe bez ścisłej współpracy zespołem Pani prof. dr hab. Elżbiety Pękali z Zakładu Biochemii Farmaceutycznej UJ CM, który realizował projekt finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Opus *„Nowoczesna fotoprotekcja – opracowanie skutecznych i bezpiecznych filtrów UV w grupach pochodnych arylidenohydantoiny i kwasu cynamonowego.*

Syntetyczny i systematyczny opis uzyskanych wyników zaprezentowany został w omawianej rozprawie doktorskiej na 57 stronach. Pracę uzupełniają cztery strony poświęcone podsumowaniu i wnioskom. Piętnaście stron poświęcono na przedstawienie metodologii badań. Odnośniki literaturowe obejmują 233 pozycje oraz trzy prace oryginalne w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences*, *Molecules* oraz *Chemosphere*, gdzie Pani mgr Justyna Popiół jest pierwszym autorem. Pod względem merytorycznym jest to więc opracowanie wartościowe, oparte w dużej mierze o wyniki badań naukowych, które zostały opublikowane, a to z kolei wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki. Praca jest bardzo ładnie wydana, co niewątpliwie wymagało dodatkowego nakładu pracy i wysiłku intelektualnego. Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem wskazać drobne niedociągnięcia oraz nieścisłości obecne w omawianym opracowaniu:

Strona 14: „promieniowanie UVC z uwagi na to, iż pochłaniane jest przez warstwę ozonową nie wywołuje w normalnych warunkach negatywnych reakcji biologicznych [1]." Sens tego zdania jest jasny aczkolwiek wymaga to racjonalizacji w domyśle: w normalnych warunkach słoneczne promieniowanie w zakresie UVC nie wywołuje negatywnych reakcji biologicznych, ponieważ jest pochłaniane jest przez warstwę ozonową. Powyższe stwierdzenie nie musi być jednak zawsze prawdziwe, gdyż tzw. *dziura ozonowa* sporadycznie pojawia się nad zamieszkałymi rejonami kuli ziemskiej. „Promienie w zakresie UVB w około 90% są absorbowane przez naskórek i ich ingerencja jest powierzchowna" – słownik języka polskiego PWN wskazuje, że ingerencja to wtrącanie się w cudze sprawy.

Strona 20: „Z punku widzenia ochrony przeciwsłonecznej bardzo korzystne jest położenie para. W takich związkach zdelokalizowane elektrony rozciągają się nad całą powierzchnią cząsteczki, co przekłada się na przesunięcie batochromowe przewyższające sumę indywidualnych podstawników." To zdanie jest bardzo nieprecyzyjne, ponieważ czytelnik nie wie czym ta *suma* właściwie jest. Określenie „zdelokalizowane elektrony rozciągają się nad całą powierzchnią cząsteczki" także jest nieprecyzyjne. W cząsteczkach obecne są orbitale molekularne, które bardzo rzadko obejmują całą cząsteczkę. Bez symulacji widm absorpcji UV z zastosowaniem

metod modelowania cząsteczkowego właściwszym byłoby powiedzieć, że wprowadzenie podstawnika auksochromowego do chromoforu zmienia energię wzbudzenia cząsteczki, a podstawniki zawierające sprzężony układ wiązań π zazwyczaj powodują przesunięcia batochromowe – jest to związane z obniżeniem różnicy energii stanu podstawowego i wzbudzonego oraz zwiększeniem objętości (wielkości lub rozległości) odpowiadających im orbitali (np. HOMO/LUMO lub HOMO-1/LUMO).

Listę zażaleń recenzenta uzupełniają drobne uchybienia stylistyczne i merytoryczne znalezione w pracy: strona 26 „Jeżeli chodzi o padymat O" to kolokwializm; strona 28 „Związki te mogą nie tylko zapobiegać obniżeniu efektywności działania filtra." - styl; strona 30 „Próbki krwi pacjentów zbierano przez 7 dni". – pacjent z definicji jest chory, a tu raczej wykorzystano zdrowych ochotników; strona 49 „zaplanowano wykonanie przesiewowych badań absorpcji promieniowania ultrafioletowego w rozcieńczonych roztworach." – *przesiewowe* (badania laboratoryjne) w kontekście kompleksowych badań absorpcji celem wyłonienia związków o najlepszej charakterystyce brzmi niezręcznie; strona 49 „(3-(4-metylobenzylideno)kamfora" zamiast 3-(4-metylobenzylideno)kamfora; strona 49 „metodologii opartej o zmodyfikowaną europejską normę EN ISO 24443:2012." – czytelnik zastanawia się kto tę normę zmodyfikował - Doktorantka czy ustawodawca?; strona 63 „Zakres wyznaczonych wartości współczynnika R_{M0} był zróżnicowany w zależności od budowy chemicznej związku." – styl; błąd stylistyczny przewijający się w całej pracy: „wodorów", „azotów" lub „węgli", np. pierścieni aromatycznych, zamiast atomów wodoru, azotu lub węgla.

Powyższe uwagi mają charakter formalny i w niczym nie umniejszają wartości przedstawionych wyników badań. Przedstawiona rozprawa doktorska imponuje zakresem przeprowadzonych eksperymentów i jest bardzo dobrze napisana. Z kolei Pani Justynie Popiół należą się wyrazy uznania za konsekwencję i zaangażowanie w realizację bardzo ambitnego projektu badawczego.

Efektem realizacji pracy doktorskiej było zaprojektowanie i synteza (*E*)-cynamoilowej pochodnej ksantonu (związek 9), której opracowana formulacja charakteryzuje się wysoką wartością krytycznej długości fali (381 nm) oraz odpowiednim stosunkiem ochrony UVA/UVB (0,830). Ocena fototrwałości półstałej kompozycji promieniochronnej zawierającej otrzymany związek wskazuje, że uzyskano fotostabilny filtr UV. Ponadto wykazano, że opracowana pochodna (*E*)-cynamoilowa ksantonu w zakresie zastosowanych stężeń jest bezpieczna względem ludzkich keratynocytów, fibroblastów skóry ludzkiej, komórek nowotworu wątrobowo-komórkowego oraz mysich astrocytów, czego wyrazem była mniejsza cytotoksyczność w porównaniu do referencyjnych filtrów UV.

Po przeczytaniu rozprawy recenzentowi nasuwają się dwa pytania. W tabeli 12 przedstawiono procentowy skład opracowanych formulacji. Dla związków 18 i 19 zaproponowano 4,8% dimetylosulfotlenku (DMSO), a dla pochodnych 20-23 48% tego rozpuszczalnika. Czy istnieją

jakieś normy określające maksymalną zawartość DMSO w produktach kosmetycznych i czy Pani zdaniem aplikacja kosmetyku zawierającego DMSO jest bezpieczna? W części doświadczalnej znajdujemy informację, że związki 1-17 krystalizowano z mieszanin rozpuszczalników organicznych z dodatkiem żelu krzemionkowego. Czemu ma służyć ten dodatek i czy nie obawia się Pani, że związki uzyskane w ten sposób są zanieczyszczone krzemionką?

Pani mgr Justyna Popiół może pochwalić się znaczącym dorobkiem naukowym, który obejmuje 11 oryginalnych artykułów naukowych, 5 przeglądowych oraz dwa zgłoszenia patentowe. Doktorantka jest zaangażowana w realizacje 6 projektów naukowych. Ponadto pełni funkcję kierownika zespołu badawczego realizującego prace przedwdrożeniowe *„Pochodne ksantonu i ich zastosowanie jako substancje promieniochronne w produktach kosmetycznych"* w programie *Inkubator Innowacyjności 4.0*.

Podsumowując, z satysfakcją stwierdzam, że oceniania rozprawa doktorska jest osiągnięciem oryginalnym, wnosi elementy nowości naukowej do wiedzy w zakresie chemii i aplikacji związków fotoprotekcyjnych i pod każdym względem spełnia wymagania określone w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ o dopuszczenie mgr Justyny Popiół do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję także o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej, ponieważ jest to opracowanie wyczerpujące i spełnia wszystkie wymagania zawarte w *Regulaminie Wyróżniania Rozpraw Doktorskich*.

Katedra Zakład
Chemii Organicznej
dr hab. Jarosław Sączewski
adiunkt