

Dr Piotr Wałejko

Załącznik 2

Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych albo artystycznych, w szczególności osiągnięcia, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789), w języku polskim;

AUTOREFERAT

(wersja polskojęzyczna)
do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego
w dziedzinie nauk chemicznych w dyscyplinie chemia.

Dr Piotr Walejko

Tytuł osiągnięcia naukowego:

*Synteza i analiza strukturalna nowych pochodnych
estrowych i glikozydowych witaminy E oraz modelowych fenoli.*

Białystok 2019

1. Imię i nazwisko: Piotr Wąlejko

Adres służbowy: Zakład Chemii Produktów Naturalnych
Instytut Chemii, Wydział Biologiczno-Chemiczny
Uniwersytet w Białymstoku
ul. Ciołkowskiego 1K
15-245 Białystok
tel. 85 7388086
e-mail: pwalejko@uwb.edu.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

magister chemii, Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku, 1995
rozprawa magisterska pt. „*Synteza pochodnych glukozydowych α - tokoferolu*”, wykonana pod kierunkiem dr hab. Stanisława Witkowskiego, prof. UwB.

doktor nauk chemicznych, Uniwersytet w Białymstoku, 2005
rozprawa doktorska pt. „*Synteza i badania strukturalne glikozydów α - tokoferolu oraz jego pochodnych*”, promotor dr hab. Stanisław Witkowski, prof. UwB.

3. Informacje o przebiegu pracy naukowej

1995-2006	Uniwersytet w Białymstoku; Wydział Biologiczno-Chemiczny (wówczas Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy), Zakład Chemii Produktów Naturalnych, asystent
01.07.2006-31.09.2006	Staż naukowy w zespole prof. Armina de Meijere, Uniwersytet w Getyndze, (<i>Postdoctoral Research Scientist, The Institute of Organic and Biomolecular Chemistry, George-August University in Goettingen, Germany</i>).
15.10.2006-15.10.2007	Staż podoktorski w zespole prof. Michela Rohmera, Uniwersytet L. Pasteura w Strasburgu, (<i>Postdoctoral Research Scientist, The Institute Le Bel, University of Louis, Pasteur in Strasbourg, France</i>).
2007- do chwili obecnej	Uniwersytet w Białymstoku, Zakład Chemii Produktów Naturalnych, Wydział Biologiczno-Chemiczny, asystent (1995-2009), adiunkt (2009-...).

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Synteza i analiza strukturalna nowych pochodnych estrowych i glikozydowych witaminy E oraz modelowych fenoli.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

	Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	IF 1996-20..	IF _{5lat}	Liczba pkt. MNiSW	Liczba cytowań*
H1	A. Baj, <u>P. Wałęjko</u> , S. Witkowski, "Synthesis of new carbacyclic analogs of trolox", <i>Monatshefte für Chemie</i> , 146, 375-382 (2015). DOI 10.1007/s00706-014-1349-8	1.131 IF ₂₀₁₅	1.188	25	1
H2	<u>P. Wałęjko</u> , K. Paradowska, Ł. Szeleszczuk, S. Wojtulewski, A. Baj, „Racemic crystals of Trolox derivatives compared to their chiral counterparts: Structural studies using solid-state NMR, DFT calculations and X-ray diffraction”, <i>Journal of Molecular Structure</i> , 1156, 290-300 (2018). DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.11.107	2.011 IF ₂₀₁₈	1.784	20	1
H3	D. K. Stępień, M. K. Cyrański, Ł. Dobrzycki, <u>P. Wałęjko</u> , A. Baj, S. Witkowski, K. Paradowska, I. Wawer, "The effect of rotating substituent in 2,2,5,7,8-pentamethylchroman derivatives. X-ray, ¹³ C CPMAS analysis and DFT analysis", <i>Journal of Molecular Structure</i> , 1076, 512-517 (2014). DOI:10.1016/j.molstruc.2014.08.003	1.602 IF ₂₀₁₄	1.784	20	3
H4	<u>P. Wałęjko</u> , Ł. Dobrzycki, A. Ratkiewicz, P. Socha, S. Witkowski, M. K. Cyrański, „The X-ray and Natural Bond Orbital (NBO) structural study of α-tocopheryl and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-yl succinates”, <i>Journal of Saudi Chemical Society</i> , 23, 365–377 (2019). DOI: 10.1016/j.jscs.2018.08.010	2.456 IF ₂₀₁₈	2.912	30	0
H5	<u>P. Wałęjko</u> , S. Witkowski, "Selective removal of phenyl group from alkyl diphenyl phosphates", <i>Journal of Saudi Chemical Society</i> , 21, 118–122 (2017). DOI: 10.1016/j.jscs.2016.05.002	2.456 IF ₂₀₁₇	2.912	30	0
H6	<u>P. Wałęjko</u> , A. Baj, "The synthesis of vitamin E sugar 1,2-ortho esters", <i>Monatshefte für Chemie</i> , 150, 275-282 (2019). DOI 10.1007/s00706-018-2332-6.	1.285 IF ₂₀₁₈	1.188	25	0
H7	A. Hryniewicka, <u>P. Wałęjko</u> , J.W. Morzycki, S. Witkowski, "Synthesis of new type of vitamin E glycoconjugates" <i>Polish Journal of Chemistry</i> , 83, 75-80 (2009)	0.523 IF ₂₀₀₉	0.380	20	0
H8	R. B. Nazarski, <u>P. Wałęjko</u> and S. Witkowski, "Multi-conformer molecules in solutions: An NMR-based DFT conformational study of two glucopyranosides of vitamin E model compound", <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> , 14, 3142 – 3158 (2016). DOI: 10.1039/C5OB01865J	3.564 IF ₂₀₁₆	3.138	35	5

H9	P. Wałęjko, K. Paradowska J. Bukowicki, S. Witkowski, I. Wawer, "Phenyl Galactopyranosides - ¹³ C CPMAS NMR and conformational analysis using genetic algorithm", <i>Chemical Physics</i> , 457(1), 43-50 (2015). DOI: 10.1016/j.chemphys.2015.05.015	1.758 IF ₂₀₁₅	1.661	25	1
H10	P. Wałęjko, J. Bukowicki, Ł. Dobrzycki, P. Socha, K. Paradowska, "Phenyl glycosides - Solid-State NMR, X-ray diffraction and conformational analysis using genetic algorithm", <i>Chemical Physics</i> , 519, 126-136 (2019). DOI: 10.1016/j.chemphys.2018.12.001.	1.707 IF ₂₀₁₈	1.661	25	0
	Razem	18.493	18.668	255	11

*liczba cytowań na dzień 01. 03.2019

W skład osiągnięcia naukowego, zgłoszonego do postępowania habilitacyjnego wchodzi dziesięć prac oryginalnych, dotyczących syntezy oraz badań konformacyjnych w badanych układach. Prace [H-1 – H-10] w większości zostały opublikowane w latach 2014 – 2019 (cztery w ostatnich dwóch latach), a jedynie praca [H-7] opublikowana była w roku 2009. Łączny współczynnik oddziaływania IF wymienionych dziewięciu prac wynosi 18.668, a pięcioletni IF 18.493. Łączna punktacja prac wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 255 pkt (wartości średnie dla prac [H-1 – H-10] wynoszą odpowiednio IF 1.866 oraz pkt MNiSW 25.5).

Całkowita liczba publikacji w dorobku habilitanta wynosi 38 prac, z czego 29 znajdujących się w bazie ICR oraz 9 spoza bazy ICR. Sumaryczny IF publikacji habilitanta wynosi 44.547 IF (pięcioletni IF = 44.448) przy średnim IF = 1.5337 publikacji z listy ICR, przy całkowitej liczbie punktów MNiSW 649. Dorobek przed doktoratem (2005) stanowiło sześć publikacji z IF = 4.603 (102 pkt. KBN/MNiSW), po doktoracie 23 publikacje o łącznym IF = 39.944 (pięcioletni IF = 41.119), ilość punktów MNiSW 512 pkt (wartości średnie dla publikacji po doktoracie IF = 1.737, MNiSW = 22.3 pkt).

Jestem współtwórcą patentu dotyczącego syntezy witaminy K2 (MK-7) („*Process for preparation of MK-7 type of vitamin K2*”). Patent uzyskał ochronę między innymi na terenie krajów Unii Europejskiej (EP 2917171 B1) oraz USA (US 9,828,323 B2). Nad wdrożeniem uzyskanych patentów pracuje firma Nattopharma R&D będącą współtwórcą zgłoszenia patentowego.

Podsumowanie całego dorobku na dzień 01.03.2019 r:

Całkowita liczba publikacji	38
w czasopismach znajdujących się w bazie JCR	29
monografie, publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych, nieznajdujących się w JCR	9
liczba publikacji wchodzących w cykl osiągnięcia naukowego	10
Wynalazki, wzory użytkowe i przemysłowe, zgłoszenia <u>patentowe</u> ?	5
Sumaryczny <i>IF</i> według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania	44.547
pięcioletni <i>IF</i>	44.448
Sumaryczny <i>IF</i> publikacji wchodzących w cykl osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania	18.493
pięcioletni <i>IF</i>	18.608
Całkowita liczba punktów MNiSW	649
Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS)	
na dzień 01.03.2019	97
bez autocytowań	69
Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS)	6
Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi	1
udział w takich projektach	7
Całkowita liczba doniesień konferencyjnych (wykładów, komunikatów, posterów)	53
Organizacja i prowadzenie zajęć w zakresie popularyzacji chemii	3
Liczba artykułów popularyzujących chemię	1
Liczba wykładów popularyzujących chemię	3

Lista skrótów:

α -Toc - α -tokoferol

α -ToS - kwaśny bursztynian α -tokoferylu lub wodorobursztynian α -tokoferylu (nazwa zwyczajowa bursztynian α -tokoferolu)

α -Toc[•] - rodnik α -tokoferylowy

PMC - 2,2,5,7,8-pentametylo-chroman-6-ol, (nazwa zwyczajowa: chroman-6-olⁱ)

Troloks - kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowyⁱⁱ)

DIPEA - *N,N*-diizopropyletyloamina

TBAI - jodek tetrabutylamonowy

EPR - spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*)

IR - spektroskopia w podczerwieni (ang. *Infrared Spectroscopy*)

MS - spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*)

NMR - spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*Nuclear Magnetic Resonance*)

CPMAS - and. *Cross Polarization Magic Angle Spinning*

MAS - ang. *Magic Angle Spinning*

XRD - rentgenowska analiza dyfrakcyjna (ang. *X-Ray Diffraction analysis*)

CCDC - Cambridge Crystallographic Data Centre

DFT - Teoria funkcjonału gęstości (*Density Functional Theory*)

D-H⁺A - Donor-H⁺Akceptor - wiązanie wodorowe

GIPAW DFT - Gauge-Including Projector-Augmented Wave Density Functional Theory

GIAO DFT - Gauge-Independent Atomic Orbital Density Functional Theory

GA - Algorytm Genetyczny

GAAGS - Systematyczne Przeszukiwanie Wspomagane Algorytmem Genetycznym (*Genetic Algorithm –Assisted Grid Search*)

f^+ , f^- i f^0 - funkcje Fukui (*condensed or atomic Fukui function*)

$f^2(r)$ - podwójne deskryptory funkcji Fukui (*Fukui function dual descriptor*)

NBO - metoda naturalnych orbitali atomowych (*Natural Bond Orbital Method*)

BHT - 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylofenol

δ - przesunięcie chemiczne

σ - stała ekranowania

ⁱ w autoreferacie stosowana będzie nazwa zwyczajowa chroman-6-ol lub chromanol

ⁱⁱ w autoreferacie stosowana będzie spolszczona nazwa handlowa Troloks

C) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Celem naukowym prac przedstawionych w rozprawie habilitacyjnej była synteza oraz badania strukturalne nowych estrowych i glikozydowych pochodnych witaminy E o zwiększonej amfifilowości (glikokoniugaty α - tokoferolu) oraz poznanie ich właściwości spektroskopowych i mechanizmów powstawania. W przedstawionych pracach badałem wpływ różnego typu podstawników w pozycji C-6 na efekty konformacyjne i elektronowe w układzie 2,5,7,8-tetrametylochroman-6-olowym. Przedstawiłem również wyniki badań dynamiki konformacyjnej w α/β -*O*-glikozydach chroman-6-olu oraz szeregu *O*-glikozydów arylowych.

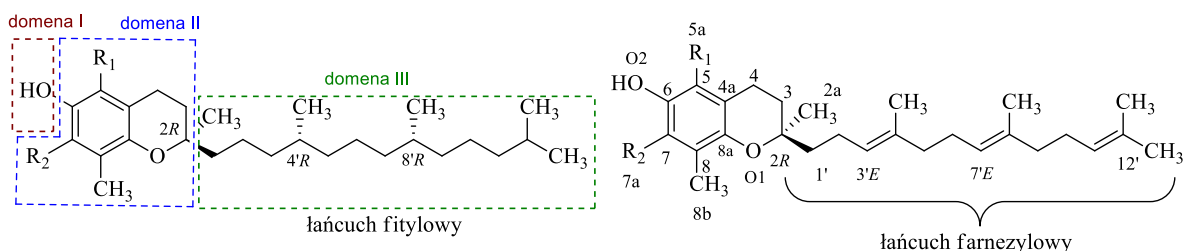
Na podkreślenie zasługuje fakt, że podjęta przeze mnie tematyka badawcza wymagała wieloaspektowego podejścia z uwagi na złożoność problematyki związanej z zakresem i mechanizmem działania witaminy E. Wiedza na jej temat, pomimo że jest badana od wielu dziesięcioleci przez specjalistów z różnych dziedzin, jest nadal niekompletna. Witamina E to grupa związków o zbliżonej budowie chemicznej wykazujących jednak różnorodne działanie biologiczne, która jest ciągle fascynującym obiektem badań zajmujących uwagę naukowców z obszarów nauk medycznych, biologicznych, fizycznych jak też i syntezy organicznej.

Motywy przewodnim, wokół którego skupiały się moje zainteresowania naukowe, była synteza oraz badanie właściwości chemicznych i fizykochemicznych związków naturalnych w tym pochodnych witamin rozpuszczalnych w tłuszczach: E, D i K a także szeregu flawonoidów, terpenów czy polifenoli. Jednakże uwagę swoją skupiałem głównie na rozwijaniu zagadnień związanymi z witaminą E.

W trakcie badań syntetycznych nad właściwościami strukturalnymi odpowiedzialnymi za funkcje biologiczne witaminy E stwierdziłem, że konieczne jest włączenie nowych technik dla lepszego rozpoznania tej problematyki. Przy bardziej interdyscyplinarnym podejściu, bez skupiania się wyłącznie na aspektach syntetycznych, mogłem uzyskać szereg nowych danych fizykochemicznych dotyczących witaminy E. Dzięki połączeniu ukierunkowanej syntezy organicznej z dynamicznie rozwijającymi się metodami obliczeniowymi oraz analizą XRD udało mi się w sposób bardziej całościowy podejść do problematyki badawczej. W pracach [H1-H10] starałem się wykorzystać

doświadczenie w syntezie organicznej i analizie spektroskopową z coraz bardziej dostępnymi metodami obliczeniowymi, co znacznie poszerzyło możliwości badawcze.

W odniesieniu do witaminy E należy podkreślić, że jest ona, co prawda znana od ponad 90 lat jakkolwiek poglądy na temat jej roli w organizmach żywych ewoluowały przez lata w miarę rozpoznawania, co raz to nowszych aspektów jej działania biologicznego. Po raz pierwszy witaminę E rozpoznano, jako czynnik pochodzenia roślinnego, niezbędny do prawidłowej reprodukcji zwierząt. Obecnie wiadomo, że witamina E pełni nie tylko funkcje antyutleniacza, ale że pełni ona również szereg innych funkcji niezwiązanych z działaniem antyoksydacyjnym. Należy podkreślić, że pomimo prowadzonych od kilkudziesięciu lat intensywnych badań, pełny mechanizm i zakres jej działania nie został jeszcze w pełni poznany¹⁻³.



Tokoferole	R ₁	R ₂
α-tokoferol (1)	CH ₃	CH ₃
β-tokoferol (2)	CH ₃	H
γ-tokoferol (3)	H	CH ₃
δ-tokoferol (4)	H	H

Tokotrienole	R ₁	R ₂
α-tokotrienol (1a)	CH ₃	CH ₃
β-tokotrienol (2a)	CH ₃	H
γ-tokotrienol (3a)	H	CH ₃
δ-tokotrienol (4a)	H	H

Rys. 1. Struktura chemiczna tokoferoli (1-4) i tokotrienoli (1a-4a).

α-Tokoferol (1) został odkryty, jako pierwszy przedstawiciel grupy związków określanych wspólną nazwą witamina E. Jest jej dominującą formą i tylko jego suplementacja w pełni eliminuje skutki niedoboru witaminy E. Witamina E to ogólna nazwa grupy związków tzw. tokochromanoli: czterech tokoferoli (1-4) oraz czterech tokotrienoli (1a-4a). W ich strukturze wyróżniamy układ chroman-6-olu, w tokoferolach podstawiony w pozycji C2 łańcuchem fitylowym (C₁₆H₃₃), natomiast w tokotrienolach farnezylowym (C₁₆H₂₇). Poszczególne tokoferole (1-4) i tokotrienole (1a-4a) różnią się ilością i położeniem grup metylowych w pierścieniu aromatycznym układu chromanolowego i oznaczane są symbolami odpowiednio: α-, β-, γ- i δ- (Rys. 1). W strukturze tokochromanoli wyróżniamy dwa główne fragmenty, nadające całej cząsteczce charakter amfifilowy - polarną „głowę” (układ chroman-6-olowy) oraz hydrofobowy „ogon” (łańcuch fitylowy lub farnezylowy).

Wykazano, że obecność grupy fenolowej odpowiada za antyoksydacyjne i antyrodnikowe działanie witaminy E. Z kolei łańcuch boczny odpowiada za odpowiednie wbudowywanie się cząsteczki witaminy w podwójne warstwy fosfolipidowe błon⁴⁻⁷.

Unikalne funkcje witaminy E w organizmach żywych związane są z jej szczególną budową chemiczną. W jej strukturze można wyróżnić trzy domeny odpowiedzialne za jej właściwości biologiczne^{8,9}. Domena pierwsza tzw. funkcyjna (grupa fenolowa) – odpowiada głównie za działanie antyoksydacyjne^{1,3,10}. Domena druga (układ chromanowy) – pełni funkcje sygnalizacyjne witaminy¹¹⁻¹⁴ oraz domena trzecia (łańcuch boczny) – odpowiada za odpowiednie zakotwiczenie się tokochochromanoli w błonach (Rys. 1)¹⁵⁻¹⁷.

Dzięki obecności grupy fenolowej witamina E wykazuje silne działanie antyoksydacyjne i jako tzw. „*chain-breaking antioxidant*” efektywnie przeciwdziała wytwarzaniu się nadmiernych ilości wolnych rodników w błonach komórkowych i innych strukturach lipidowych³. Witamina E hamuje peroksydację reszt nienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach na etapie propagacji, chroniąc istotne składniki membran przed utlenianiem¹⁸. Jej rola polega na przekazywaniu hydroksylowego atomu wodoru (Ar-OH) na rodnik nadtlenkowy (LOO[•]) powstający w łańcuchach WNKT (Wielonienasycone Kwasy Tłuszczowe), z utworzeniem wodoronadtlenków lipidowych (LOOH)^{1,10,18}, które ulegają następnie redukcji. Aktywność antyoksydacyjna poszczególnych tokoferoli (**1-4**) zależy od ilości oraz sposobu rozmieszczenia grup metylowych w pierścieniu aromatycznym. Spośród tokoferoli (**1-4**) najwyższą aktywność w teście na resorpcję płodu wykazuje α -tokoferol (100%), podczas gdy aktywność β -tokoferolu jest o połowę mniejsza (50%), natomiast γ - i δ -tokoferole wykazują zaledwie odpowiednio 10% i 3% aktywności, jaką wykazuje α -tokoferol¹⁹.

Witamina E wykazuje również aktywność o charakterze nie-antyoksydacyjnym. Pełni funkcje sygnałowe oraz wywiera wpływ na receptory komórek, czynniki transkrypcyjne, a także aktywność różnych enzymów. Do tych ostatnich należy regulacja aktywności takich enzymów jak: kinazy białkowe C (PKC), fosfataza białkowa 2A (PP2A), fosfolipaza A2 (PLA₂) i inne^{11,13}, których aktywność zależy od stanu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej (*regulated by the redox state*)²⁰. Inhibicja PKC, pełniącej kluczową rolę w hamowaniu proliferacji komórek mięśni gładkich, ma istotny wpływ na rozwój takich chorób jak arterioskleroza czy nadciśnienie tętnicze. Obecność długiego łańcucha fitylowego lub farnezylowego nie ma znaczącego wpływu na działanie antyoksydacyjne. Przyczynia się natomiast do jej właściwego zakotwiczenia w błonach

komórkowych, którym nadaje odpowiednie właściwości strukturalno-funkcjonalne, takie jak właściwa płynność, trwałość i przepuszczalność^{15-17,21}. Należy zaznaczyć, że α -tokoferol pełni funkcje biologiczne przy bardzo niskich stężeniach (jedna cząsteczka α -tokoferolu przypada średnio na 100 do 1000 cząsteczek reszt fosfolipidowych)¹⁵. Tokotrienole, zwane „witaminą XXI-wieku”²²⁻²⁴, dzięki nienasyconości w łańcuchu alkilowym, wykazują większą mobilność oraz bardziej równomierną dystrybucję w membranach fosfolipidowych^{25,26}. Dane NMR wskazują, że pierścień chromanolowy α -tokotrienolu (**1a**) jest usytuowany bliżej powierzchni membrany niż w przypadku α -tokoferolu (**1**), co zwiększa jego aktywność antyoksydacyjną²⁷.

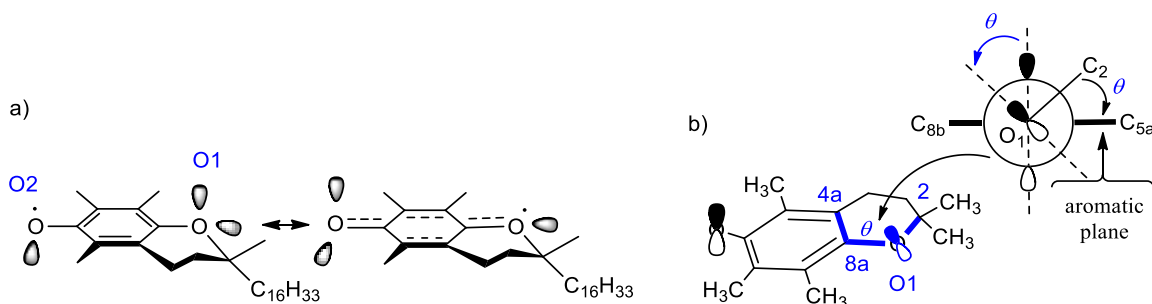
Tokoferole (**1-4**) pochodzenia naturalnego, z uwagi na obecność trzech centrów stereogenicznych, posiadają konfiguracje C2R C4'R oraz C8'R. Natomiast naturalne tokotrienole (**1a-4a**) mają konfigurację C2R oraz konfiguracje *trans* w łańcuchu farnezylowym w pozycji C3' i C-7'^{1,2} (Rys. 1). Tokoferole (**2-4**) i tokotrienole (**1a-4a**) wykazują znacznie mniejszą aktywność (test na resorpcję płodu) w stosunku do *RRR*- α -tokoferolu (**1**) - najważniejszego witameru, wykazującego najwyższą aktywność biologiczną^{28,29}.

Witamina E jest szeroko stosowana, jako składnik produktów leczniczych, preparatów kosmetycznych, suplementów diety itp.³⁰. Zazwyczaj w tego typu preparatach stosowany jest syntetyczny *all-rac*- α -tokoferol (C2R/S, C4'R/S i C8'R/S) o niższej zawartości naturalnego izomeru 2R,4'R,8'R. Należy podkreślić, że wszystkie tokochromanole wchłaniane są w jelicie cienkim z pożywienia w identycznym stopniu^{31,32}. Skuteczność wchłaniania witaminy E wynosi od 25 do 75% i w dużym stopniu zależy od zawartości tłuszczów w diecie. Pobrane z pożywienia tokochromanole są transportowane przez układ limfatyczny i krwionośny do wątroby, gdzie *RRR*- α -tokoferol jest preferencyjnie wiązany przez białko α -TTP (*α -tocopherol transfer protein*), a następnie transportowany do tkanek¹¹. Największe powinowactwo do białka α -TTP wykazuje *RRR*- α -tokoferol natomiast pozostałe tokochromanole i stereoizomery α -tokoferolu są słabiej związane (powinowactwo do α -TTP: *RRR*- α -tokoferol = 100%, β -tokoferol 38%, γ -tokoferol 9%, δ -tokoferol 2%, *SRR*- α -tokoferol 11%). W konsekwencji, do komórek efektywnie dostarczany jest naturalny *RRR*- α -tokoferol (**1**), natomiast jego nadmiar oraz pozostałe witamery są szybciej metabolizowane i wydalane³³⁻³⁵. Metabolizm tokoferoli odbywa się przy współdziałaniu receptora pregnanowego (PGX) i cytochromu p450³⁶⁻³⁸. W konsekwencji organizm

utrzymuje właściwy poziom *RRR*- α -tokoferolu poprzez jego selektywną retencję oraz metabolizm tokochromanoli.

Wykazano, że fenole posiadające w pozycji *para* podstawniki alkoksyłowe generują bardziej stabilne rodniki, w porównaniu do fenoli pozbawionych tego typu podstawników. Przykładowo *para*-metoksyfenole są pięciokrotnie bardziej reaktywne w tym aspekcie od ich *para*-metylo analogów (Tabela 1)³⁹. Podobnie α -tokoferol (**1**) wykazuje wyższą efektywność antyoksydacyjną w porównaniu z innymi stosowanymi antyutleniaczami fenolowymi (np. ok. 250 razy większa niż BHT)⁴⁰. Burton i Ingold^{41–43} upatrywali wysoką aktywność antyoksydacyjną tokoferoli w stabilizującym oddziaływaniu niewiążących par elektronowych atomu tlenu O1 pierścienia heterocyklicznego na rodnik tokoferoksyłowy (α -Toc \cdot). Autorzy ci ustalili, że za efekt stabilizujący odpowiada częściowe nakładanie się orbitalu typu *p*, zawierającego niewiążące pary elektronowe atomu tlenu O1 z orbitalami SOMO rodnika aryloksyłowego, poprzez układ π -elektronowy pierścienia aromatycznego (Rys. 2a). W efekcie, dochodzi do stabilizacji rodnika fenoksyłowego w wyniku sprzężeniowej delokalizacji elektronów (*conjugative electron delocalization*). Burton i Ingold porównując aktywność antyoksydacyjną *para*-metoksyfenoli, witaminy E oraz jej furanowych analogów (**5**) zaobserwowali, że wyższą aktywność antyoksydacyjną wykazywały układy zdolne do silniejszej delokalizacji elektronów atomów tlenu O1 i O2 (Tabela 1)⁴⁴. Występowanie postulowanych przez Burtona i Ingolda oddziaływań stabilizujących zostało potwierdzone eksperymentalnie metodą EPR w rodnikach tokoferoksyłowych (α -Toc \cdot)⁴⁵.

Zgodnie z danymi literaturowymi, do oceny stopnia oddziaływania orbitali atomów tlenu O1 i O2 w chroman-6-olach stosuje się wartość kąta dwuściennego θ , opisywanego jako: C8a-C4a-O1-C2. Graficzną prezentację kąta θ w tokoferolach przedstawiono na Rysunku 2b.

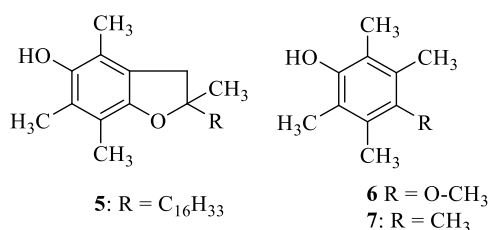


Rys. 2. Graficzna prezentacja: a) struktur rezonansowych α -Toc \cdot b) kąta dwuściennego θ (C4a-C8a-O1-C2).

Ingold i Burton badania nad aktywnością antyoksydacyjną witaminy E i jej pochodnych prowadzili głównie w oparciu o pomiar szybkości inhibicji autooksydacji styrenu. W celu wykazania wpływu atomu tlenu O1 na aktywność antyoksydacyjną tokoferoli uzyskane wartości porównywali z aktywnością modelowych fenoli (*p*-metoksytetrametylofenolu (**6**) lub pentametylofenolu (**7**)). Należy zauważyć, że ich struktura znacznie odbiegała od struktury witaminy E.

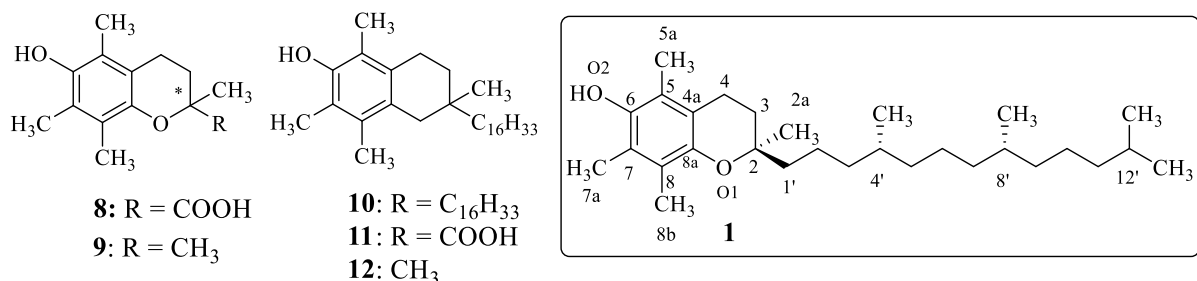
Tabela 1. Porównanie względnej aktywności antyoksydacyjnej i wartości kąta dwuściennego (θ) w wybranych fenolach.

fenol	aktywność ^a	θ [°]
1	100	~ 20 ^b
5	147	~ 6 ^b
6	12	89 ^c
7	11	--



^a/ - w porównaniu α -tokoferolu (**1**), ^b/ - obliczona teoretycznie, ^c/ - na podstawie CCDC -MOPHLA.

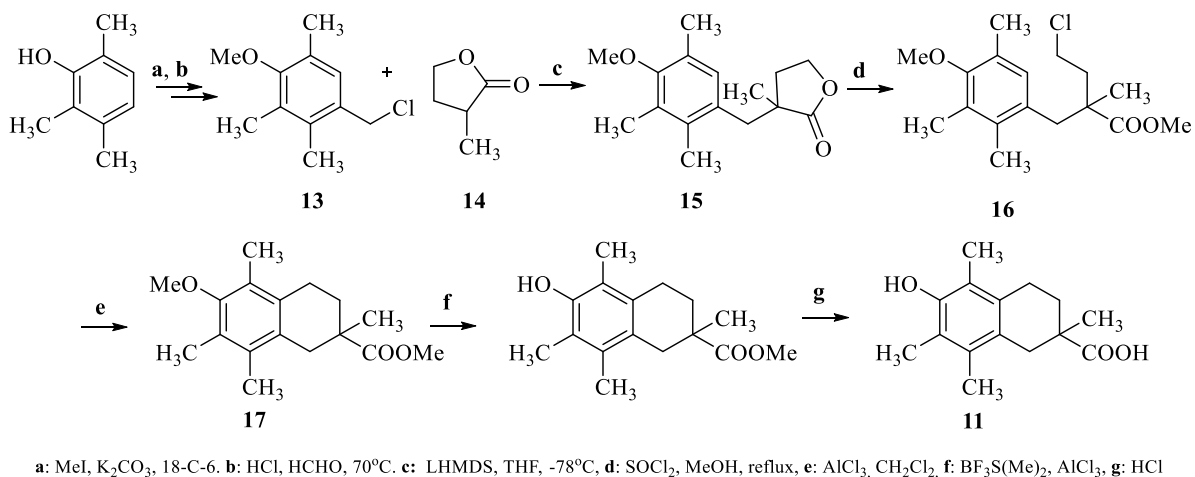
Z tego względu wydawało się celowym zsyntetyzowanie karbaanalogów α -tokoferolu (**1**) oraz jego związków modelowych: Troloksu (**8**) oraz chroman-6-olu (**9**), w których atom tlenu O1 zostałby zastąpiony atomem węgla (1-deoksy-1-karba- α -tokoferol (**10**), 1-deoksy-1-karba-Troloks (**11**) oraz 1-deoksy-1-karba-chromanol (**12**), Schemat 1). Badania z wykorzystaniem związku **10**, jak również jego analogów **11** i **12**, pozwoliłyby na bardziej precyzyjną ocenę udziału niewiążących par elektronowych atomu tlenu O1 w stabilizacji tworzących się rodników tokoferoksylowych (α -Toc \cdot). Ponadto, interesującym byłoby zbadanie efektów konformacyjnych w układzie karbaanalogu (tetrahydronaftalenu) w aspekcie mechanizmu wbudowywania się w modelowe układy fosfolipidowe (liposomalne).



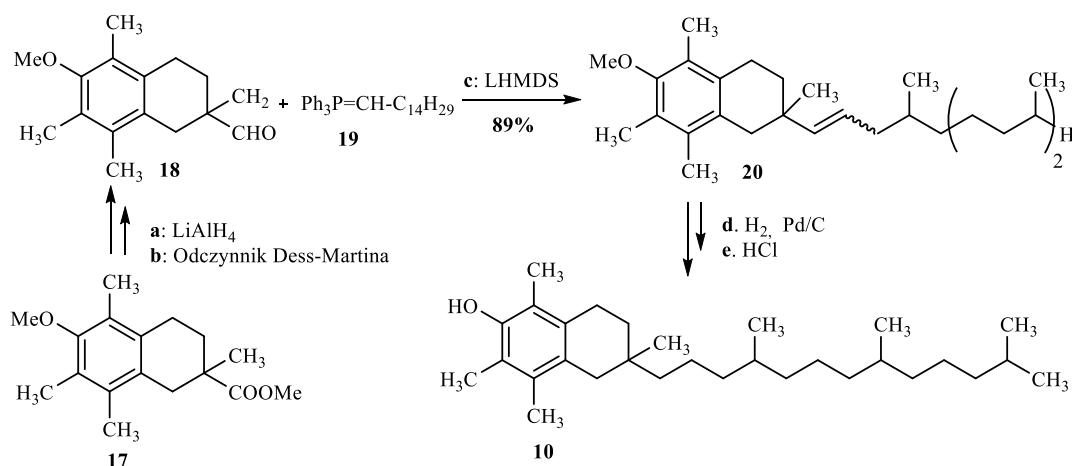
Schemat 1. Budowa chemiczna: związków modelowych witaminy E - Troloksu (**8**) oraz 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-olu (**9**), ich 1-karba analogów **10-12** oraz numeracja atomów w cząsteczce RRR- α -tokoferolu (**1**).

[H-1] A. Baj, P. Wałejko, S. Witkowski., "Synthesis of new carbacyclic analogs of trolox" *Monatsh. Chem.* 146, 375-382 (2015).

Ze względów przedstawionych powyżej pojąłem prace nad syntezą karbaanalogów α -tokoferolu (**10**), Troloksu (**11**) oraz chroman-6-olu (**12**). Przykładowa syntezę 1-deoksy-1-karba- α -tokoferolu (**10**) oraz 1-deoksy-1-karba-Troloksu (**11**) przedstawiłem na Schemacie 2 i 3. W pierwszym etapie syntezy karbaanalogu Troloksu (**11**) α -metylo- γ -butyrolakton (**14**) poddałem alkilowaniu za pomocą chlorku trimetylo-*p*-metoksybenzylowego (**13**), a otrzymany lakton **15** w reakcji z chlorkiem tionylu w metanolu został otwarty do chlorku **16**. W wyniku cyklizacji za pomocą reakcji Friedela-Craftsa wobec bezw. AlCl_3 otrzymałem układ 2-metoksy-1,2,3,4-tetrahydronaftalenu **17**, który poddałem demetylowaniu metodą Chapelata i wsp.⁴⁶, a następnie hydrolizie do docelowego 1-karba Troloksu (**11**) (Schemat 2). 1-Karbaanalog α -tokoferolu (**10**) otrzymałem za pomocą reakcji Wittiga między aldehydem **18** a wygenerowanym z odpowiedniej soli fosfonowe ylidem **19**, a następnie redukcji katalitycznej, co przedstawia Schemat 3.



Schemat 2. Synteza 1-karba Troloksu **11**.



Schemat 3. Synteza 1-karba- α -tokoferolu (**10**).

Opracowana została prosta i wydajna metoda syntezy nieopisanego dotychczas w literaturze 1-karba α -tokoferolu (**10**) oraz 1-karba Troloksu (**11**). Synteza oraz wstępne wyniki badań dotyczące właściwości antyoksydacyjnych oraz oddziaływań z błonami fosfolipidowymi uzyskanych 1-karba analogów zostały zawarte w pracy doktorskiej Anety Bajⁱⁱⁱ, której byłem promotorem pomocniczym. Do chwili obecnej opublikowana została jedynie praca dotycząca syntezy 1-karbaanalogu Troloksu (**11**)⁴⁷. W przygotowaniu do druku są następne prace zawierające opis syntezy 1-karbaanalogów tokoferolu (**10**) i chroman-6-olu (**12**) oraz badań dotyczących ich aktywności antyoksydacyjnej i oddziaływania z modelowymi błonami fosfolipidowymi^{iv}.

Jak wspominałem wcześniej pełny mechanizm działania biologicznego witaminy E pomimo prowadzenia intensywnych badań nie został jeszcze w pełni poznany. Z tego powodu dokładne poznanie dynamiki konformacyjnej w molekułe α -tokoferolu może dostarczyć nowych danych do poznania mechanizmu wbudowywania się tokoferoli w podwójne warstwy fosfolipidowe oraz sposobu, w jaki regulują one właściwości strukturalno-funkcjonalne błon.

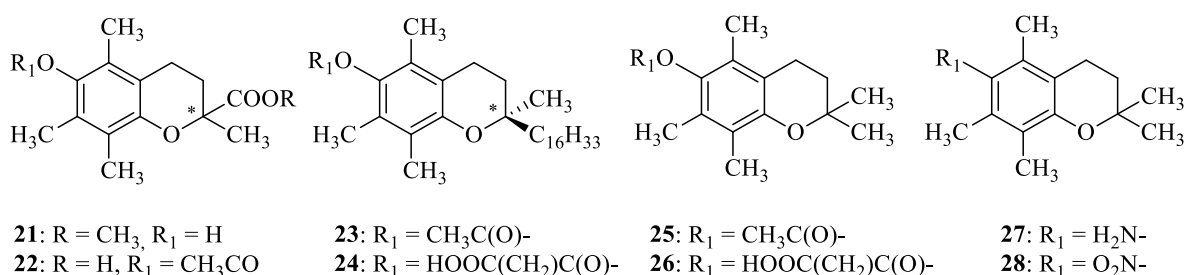
W badaniach niektórych aspektów aktywności biologicznej witaminy E oraz w badaniach strukturalnych zazwyczaj stosowane są tzw. związki modelowe witaminy E: kwas 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksyłowy, Troloks (**8**) oraz 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-ol, chroman-6-ol (**9**) (Schemat 1). Z uwagi na obecność układu

ⁱⁱⁱ Tytuł pracy: „Synteza i badania strukturalne nowych analogów witaminy E”, Wydział Biologiczno-Chemiczny UwB, 01.2019 r.

^{iv} A. Baj, E. Olchowik-Grabarek, J. Cędrowski, P. Wałęjko, S. Witkowski, „New 1-carba-analogues of vitamin E: synthesis and antioxidant study” – w przygotowaniu.

chroman-6-olowego fenole **8** i **9** wykazują aktywność antyoksydacyjną zbliżoną do α -tokoferolu (**1**), natomiast nie wykazują praktycznie aktywności biologicznej witaminy E. Ponadto pochodne **8** i **9**, w przeciwieństwie do α -tokoferolu (**1**), są ciałami stałymi, co pozwala na ich badanie za pomocą spektroskopii ^{13}C CPMAS NMR oraz dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD).

W badaniach strukturalnych dotyczących witaminy E wykorzystałem: α -tokoferol (**1**), Troloks (**8**), 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-ol (**9**, tzw. chromanol) oraz ich pochodne estrowe **21-26**, a także 6-nitro- i 6-aminochromany **27** i **28** (Schemat 4). W przypadku pochodnych krystalicznych, tworzących odpowiedniej jakości monokryształy, uzyskane dane spektroskopowe i obliczeniowe uzupełniłem wynikami uzyskanymi z pomiarów XRD. W trakcie realizacji prac wchodzących w skład niniejszej dysertacji uzyskałem szereg nowych struktur krystalicznych (CCDC: 1483208, 148309, 1483210⁴⁸, 984656⁴⁹, 1560507, 1560510⁵⁰, 1451885, 1451886, 1451887⁵¹), które znacznie poszerzają dostępną bazę danych XRD pochodnych witaminy E oraz *O*-glikozydów arylowych.



Schemat 4. Struktury chemiczne badanych pochodnych witaminy E.

Z uwagi na to, że badane związki (Schemat 4) w większości są ciałami stałymi, możliwe było zarejestrowanie widm ^{13}C CPMAS NMR w fazie stałej. Na podstawie różnicy wartości przesunięcia chemicznego sygnału w fazie stałej i roztworze ($\Delta\delta = \delta_{(\text{c. stałe})} - \delta_{(\text{roztwór})}$) wyznaczony został parametr $\Delta\delta$, którego wartości (powyżej 1 ppm) wskazywały na obecność konformacyjnie labilnych elementów w strukturze analizowanych związków. W pracach [H-2, 3 i 4] oraz [H-9 i 10] uzyskane dane eksperymentalne (XRD i ^{13}C CPMAS NMR) skorelowałem z wynikami uzyskanymi za pomocą technik modelowania molekularnego adekwatnych do rozpatrywanego problemu i dostępnych możliwości obliczeniowych w trakcie realizacji pracy.

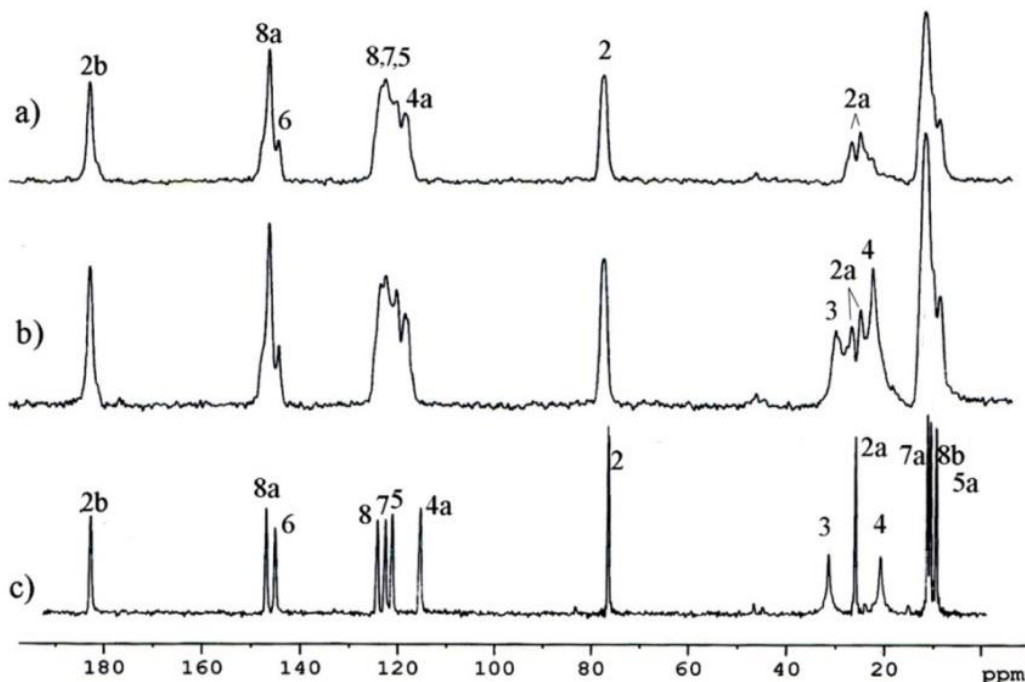
[H-2] P. Wałęjko, K. Paradowska, Ł. Szeleszczuk, S. Wojtulewski, A. Baj., „Racemic crystals of Trolox derivatives compared to their chiral counterparts: Structural studies using solid-state NMR, DFT calculations and X-ray diffraction”, *Journal of Molecular Structure*, 1156, 290-300 (2018).

Dane literaturowe wskazują, że w niektórych związkach formy racemiczne i czyste enancjomerycznie np.: kwasu asparaginowego, glutaminowego^{52,53} mają wyraźnie różne widma ¹³C NMR w fazie stałej. Z kolei porównując ich struktury krystaliczne (racemat vs. enancjomer) należy odnieść się to tzw. reguły Wallacha⁵⁴ stwierdzającej, że kryształy racematówne są gęściej upakowane, w porównaniu do ich form czystych enancjomerycznie. W pracy [H-2] podjąłem, zatem badania właściwości racematów oraz enancjomerów Troloksu i jego pochodnych, w odniesieniu do reguły Walacha oraz różnic w kształcie sygnałów w widmach ¹³C NMR w fazie stałej.

W pracy wykorzystałem handlowo dostępny *R/S* i *S*-Troloks (**8**) oraz ester metylowy i octan Troloksu **21** i **22** (Schemat 4). Związki te badałem głównie za pomocą spektroskopii ¹³C NMR w roztworze (CDCl₃) oraz fazie stałej (CPMAS), a w przypadku pochodnych krystalicznych, również za pomocą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD). Uzyskane dane eksperymentalne, wsparte zostały obliczeniami teoretycznymi z zastosowaniem metody GIPAW DFT, w której obliczenia prowadzone są dla całej komórki krystalograficznej (*gauge-including projector-augmented wave density functional theory*). W oparciu o obliczenia GIPAW DFT dla poszczególnych atomów, w badanych związkach wyznaczone zostały teoretyczne wartości stałych ekranowania σ_{iso} . Należy podkreślić, że metoda GIPAW DFT jest szczególnie użyteczna w badaniu układów, w których występują silne wiązania wodorowe⁵⁵. Ponadto, jedynie przy zastosowaniu tej metody uzyskałem dla badanych układów zadowalającą zgodność wyników eksperymentalnych z teoretycznymi. Niestety, ograniczeniem metody jest konieczność posiadania struktury krystalicznej badanej substancji. W celu weryfikacji danych obliczeniowych stałe ekranowania (σ_{iso}) przeliczone zostały na wartości przesunięcia chemicznego (δ_{iso}), a następnie wyznaczyłem zależność pomiędzy doświadczalnymi i obliczonymi wartościami przesunięcia chemicznego (δ_{CPMAS} vs. δ_{GIPAW}). Kryterium zgodności pomiędzy analizowanymi strukturami stanowił parametr R^2 (regresja liniowa), który wynosił dla badanych układów ponad 0.99.

Widma ¹³C NMR w fazie stałej zarejestrowane zostały dla wszystkich badanych racematów (*R/S*) oraz enancjomerów (*S*). Porównując widma CPMAS form *R/S* oraz *S*

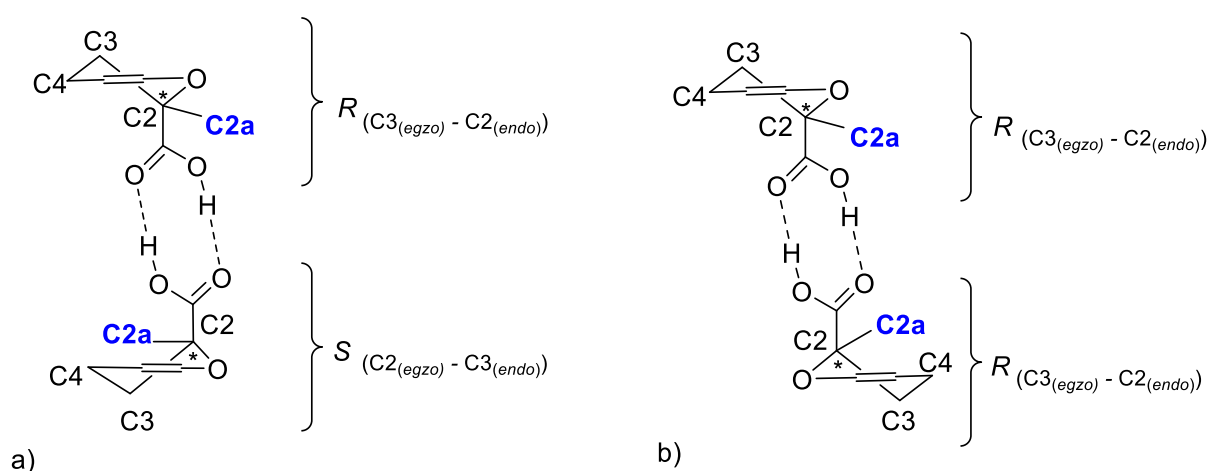
wykazałem wyraźne różnice w ekranowaniu poszczególnych atomów węgla oraz w kształcie sygnałów w widmach obu form. Przykładowo, w widmie CPMAS *S*-Troloksu obserwowałem dwa sygnały przypisane grupie metylowej C-2a, podczas gdy w widmie racematu widoczny był tylko jeden sygnał. Ponadto, sygnały w widmach *R/S*- i *S*-Troloksu różniły się wyraźnie wartościami przesunięcia chemicznego oraz szerokością połówkową, co ilustruje Rysunek 3.



Rys. 3. Widma ^{13}C CPMAS NMR Troloksu: a) **8S** z filtrem DD (*Dipolar Dephasing*), b) **8S** (*standard*), c) **8 R/S** (*standard*).

W przypadku pochodnych tworzących odpowiedniej jakości monokryształy, uzyskane wartości zostały uzupełnione danymi z pomiarów XRD. W oparciu o struktury krystalograficzne racemicznego Troloksu (**8**) oraz jego octanu **22** wykazałem, że w fazie stałej molekule tworzą struktury dimeryczne, połączone wiązaniem wodorowym. Obecność silnego międzycząsteczkowego wiązania wodorowego sugeruje znaczny efekt odsłaniania sygnału grupy karbonylowej (powyżej 182 ppm) w widmie CPMAS. W badaniach konformacji *R*- i *S*-Troloksu Górecki i wsp.⁵⁶ wykazali w oparciu o widma ECD (*electronic circular dichroism*) oraz obliczenia DFT, że w obu enancjomerach grupa karboksylowa zajmuje położenie pseudo-aksjalne względem uśrednionej płaszczyzny pierścienia chroman-6-olowego. W rezultacie enancjomer *R*- przyjmuje preferencyjnie konformacje

$C3_{(exo)}-C2_{(endo)}$, natomiast w przypadku enancjomeru *S*- preferowana jest konformacja $C3_{(endo)}-C2_{(exo)}$ (w obu grupa karboksylowa jest pseudo-aksjalna). Należy podkreślić, że są to struktury o identycznych, co do wartości kątach θ , różniących się jedynie jego znakiem. Natomiast w efekcie połączenia silnym wiązaniem wodorowym dwóch różnych enancjomerów (*R-S*) lub identycznych (np. *R-R*), możemy uzyskać struktury „pseudodiastereoizomeryczne”. W symetrycznym dimerze *R-S* atomy C2a mają identyczne otoczenie chemiczne (Rys 4a), natomiast w *R-R* jest ono różne (Rys. 4b). Skutkuje to pojawianiem się dwóch linii rezonansowych, przypisanych grupie metylowej C2a w widmie w fazie stałej, co ilustruje Rysunek 3a.



Rys. 4. Proponowane struktury dimeryczne w *R/S*-Troloksie (a) oraz *R*-Troloksie (b).

Różnice w wartościach przesunięcia chemicznego pomiędzy widmami *S*- oraz *R/S*-Troloksu (8) obserwowałem również w widmach ^{13}C NMR, rejestrowanych w roztworze CDCl_3 . Znaczące różnice $\Delta\delta = \delta_{R/S} - \delta_S$ obserwowałem dla karbonylowego atomu węgla C2b ($\Delta\delta = 1.4$ ppm) oraz grupy metylowej C2a ($\Delta\delta = 0.3$ ppm). Ponadto, oddzielne sygnały pochodzące od karbonylowego atomu węgla C2b przy 177.6 i 177.7 ppm o intensywności 1:2 obserwowałem w widmie nierównomolowej mieszaniny *R*- i *S*-Troloksu (1:2). Natomiast różnic w kształcie widm *R/S*- i *S*-Troloksu nie stwierdziłem w widmach rejestrowanych w roztworze CD_3OD . Wskazuje to, że w rozpuszczalnikach typu CDCl_3 Troloks występuje w formie struktur dimerycznych przedstawionych na Rysunku 4, natomiast w deuterowanym metanolu, który jest silniejszym donorem wiązania wodorowego, grupy karboksylowe w Troloksie nie tworzą wspomnianych struktur dimerycznych.

W ocenie stosowalności reguły Walacha wykorzystałem struktury krystalograficzne, dostępne zarówno w bazie CCDC (**8R/S**⁵⁷, **21S**⁵⁶ i **22R/S**⁵⁸), jak i nowo otrzymane w ramach realizacji niniejszej pracy (**21R/S** oraz **22S**). Należy podkreślić, że uzyskanie odpowiedniej jakości monokryształów do pomiarów dyfraktometrycznych racemicznych form **8**, **21** i **22** nie nastęcało problemów, a uzyskane monokryształy charakteryzowały się wysoką symetrią ($Z' = 1$). Jednak uzyskane kryształy wykazywały niestabilność termiczną lub krystalizowały w formie solwatu (**22R/S**). Natomiast formy czyste enancjomerycznie krystalizowały znacznie trudniej, z dużą tendencją do tworzenia solwatów (**21S** i **22S**, $Z' = 2$). W odniesieniu do reguły Walacha wykazałem, że z uwagi na ograniczoną ilość badanych struktur krystalicznych (tylko 5 struktur), trudno jednoznacznie określić zakres stosowalności w/w reguły. Pomimo podjętych prób, nie uzyskałem odpowiedniej jakości monokryształów dla par racemat–S-enancjomer Troloksu (**8**) i jego pochodnych **21** i **22**. Jedynie w przypadku estru metylowego **21** uzyskałem dane XRD dla formy *S* i *R/S*, jakkolwiek pomiary zostały wykonane w różnych temperaturach. Wyznaczone parametry strukturalne oraz gęstości kryształów w analizowanych strukturach krystalicznych zestawilem w Tabeli 2.

Tabela 2. Wybrane dane krystalograficzne dla Troloksu (**8**) i pochodnych **21** i **22**.

	8R/S	21S(A)	21S(B)	21R/S	22S(A)	22S(B)	22R/S
Nazwa kodowa	DEWVOQ02	LIXCEC		1483208	1483210	1483210	QOSQIY
θ [°]	15.3(2)	22.9(5)	33.87	22.9(2)	23.1(4)	24.1(3)	22.4(3)
komórka elementarna							
objętość [Å ³]	1259.51	1326.58		671.59	3042.74 ^a / 3149.5 ^b		1589.24
<i>Z</i>	4	4		2	4		4
<i>Z'</i>	1	2		1	2		1
układ	monoclinic	monoclinic		triclinic	ortho-rhombic		hydrate
grupa	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> 2 ₁		<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁		<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>
gęstość [g/cm ³]	1.320	1.323		1.307	1.277 ^a / 1.233 ^b		1.297
temp. [K]	283-303	100		293	100		293

^{a/} pomiar w 100K, ^{b/} w temp. 293K.

[H-3] D. K. Stępień, M. K. Cyrański, Ł. Dobrzycki, P. Wałejko, A. Baj, S. Witkowski, K. Paradowska, I. Wawer, “The effect of rotating substituent in 2,2,5,7,8-pentamethylchroman derivatives. X-ray, ¹³C CPMAS analysis and DFT analysis”, *Journal of Molecular Structure*, 1076, 512-517 (2014).

Badania dotyczące właściwości strukturalnych witaminy E prowadzone są często z zastosowaniem jej związku modelowego - 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-olu (**9**). W oparciu o dane spektroskopowe oraz techniki obliczeniowe wykazany został znaczący

wpływ grupy fenolowej (C6-OH) na ekranowanie sąsiednich atomów węgla (C5 i C7) oraz na konformacyjne pierścienia dihydropiranylowego (*2-egzo-3-endo* i *2-endo-3-egzo*)⁵⁷. Wykazano również, że rotacja podstawnika w pozycji C-6 znacząco wpływa na dynamikę konformacyjną pierścienia heterocyklicznego^{59,60}. Kontynuując wcześniejsze badania przygotowałem serię trzech różnych chromanów: 6-amino-2,2,5,7,8-pentametylochroman (**27**), 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-ol (**9**) oraz 6-nitro-2,2,5,7,8-pentametylochroman (**28**) (Schemat 4). Pochodne zostały dobrane w taki sposób, aby znacznie różniły się efektami elektronowymi, wywieranymi przez podstawnik w pozycji C6. Pierwszym jest podstawnik elektronoakceptorowy (NO₂), podczas gdy dwa pozostałe są elektrondonorowe (OH i NH₂). Celem tej pracy było zbadanie wpływu rotacji grup: NO₂, OH i NH₂ w pozycji C6 na geometrię pierścienia dihydropiranylowego. Dodatkowo na podstawie danych XRD, uzyskanych dla nitropochodnej **28** wykazałem, że w fazie krystalicznej grupa NO₂ przyjmuje orientację niemal prostopadłą do pierścienia aromatycznego, a kąt torsyjny O(2N)–N(6A)–C6–C5 wynosi 105.7°. Taka orientacja części arylovej wskazuje jednoznacznie na brak sprzężenia między grupą nitrową, a pierścieniem arylowym. Efekt ten potwierdziłem również za pomocą danych uzyskanych z analizy widm ¹³C NMR w fazie stałej oraz obliczeń teoretycznych.

W celu zbadania wpływu rotacji grup: NO₂, NH₂ i OH w pozycji C6 na geometrię cząsteczki wykonane zostały obliczenia teoretyczne, w których podstawniki poddawano rotacji co 10° (od 0° do 180°) z pełną optymalizacją geometrii na poziomie teorii B3LYP/6-311G**. Na podstawie uzyskanych wyników wykazałem, zależność bariery rotacji od rozmiaru podstawnika. Największa bariera była dla grupy nitrowej (5.9 kcal/mol), najmniejsza dla hydroksylovej (2.0 kcal/mol), natomiast dla aminowej przyjmowała wartość pośrednią (3.6 kcal/mol). Istotne zmiany w geometrii molekuł obserwowałem w bezpośrednim otoczeniu rotujących podstawników (C5 i C6) oraz wartości kąta θ (C4A–C8A–O1–C2). Wykazałem, że największe zmiany w wartości θ (θ_{\max} - θ_{\min}) powodowała rotacja podstawnika elektronoakceptorowego (NO₂, od -12.6° do -16.3°), natomiast dla elektrondonorowych OH i NH₂ wynosiła od -17.1° do -18.9°. W efekcie przeprowadzonych prac wykazałem znaczący wpływ efektu elektronowego oraz orientacji podstawnika w pozycji C6 na konformację pierścienia heterocyklicznego w 2,2,5,7,8-pentametylochromanie.

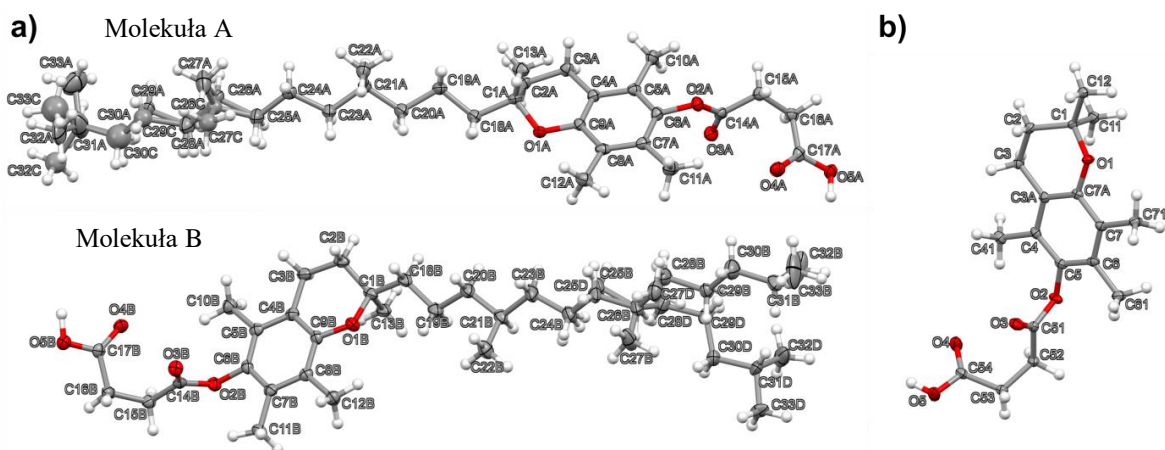
[H-4] P. Wałejko, Ł. Dobrzycki, A. Ratkiewicz, P. Socha, S. Witkowski, M. K. Cyrański, „The X-ray and Natural Bond Orbital (NBO) structural study of α -tocopheryl and 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-yl succinates”, *Journal of Saudi Chemical Society*, 23, 365–377 (2019). DOI: [10.1016/j.jscs.2018.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.08.010)

Szereg badań epidemiologicznych wskazuje, że witamina E (tokoferole) wykazuje działanie prewencyjne w stosunku do chorób nowotworowych^{61–64}. Od ponad 20 lat pojawiają się doniesienia, że kwaśny bursztynian α -tokoferolu (**24**, α -ToS) zwiększa efektywność działania chemioterapeutyków na komórki nowotworowe^{65,66}, co czyni go bardzo użytecznym w zintegrowanej ochronie przeciwnowotworowej (*integrative cancer care*). α -ToS jest badany pod kątem działania antyproliferacyjnego i proapoptycznego na komórki nowotworowe. Badania *in vitro* jak i *in vivo* wykazały jego zdolność do jednoczesnego zwiększania cytotoksyczności konwencjonalnych chemioterapeutyków (conventional therapies cytotoxicity), przy znikomej toksyczności wobec komórek normalnych^{67,68}. Doniesienia literaturowe wskazują, że podobne działanie wykazuje również kwas α -tokoferoksyoctowy (Toc-O-CH₂COOH)⁶⁹, w którym reszta kwasu octowego została połączona z α -tokoferolem wiązaniem eterowym. Działanie obydwu związków jest testowane w kombinacji z uznanymi lekami przeciwnowotworowymi takimi jak: *cis*-platyna⁷⁰ czy celecoxib^{71,72}.

Kwaśny bursztynian α -tokoferolu (**24**) jest związkiem pochodzenia naturalnego wyizolowanym po raz pierwszy z ekstraktu z jęczmienia zielonego, który stymulował uwalnianie prolaktyny i wzrost wydzielania hormonów z przysadki mózgowej⁷³. W badaniach na komórkach nowotworowych wykazano, że α -ToS wybiórczo indukuje apoptozę komórek hamując ich proliferację, powodując hamowanie wzrostu i metastazę nowotworów. Związek **24** wykazuje wysoką cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworów złośliwych przy minimalnej toksyczności w stosunku do komórek zdrowych. α -ToS wiąże się konkurencyjnie w miejscu wiążącym ubichinonu z mitochondrialnym kompleksem II łańcucha oddechowego⁶⁵. W efekcie wodorobursztynian **24** zaburza funkcje ubichinonu, skutkując „przeciekaniem” elektronów i generowaniem reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*) prowadząc do apoptozy komórek nowotworowych^{74–76}. Aktywność proapoptyczna **24** wydaje się być jego unikalną cechą, której nie posiadają inne estry α -tokoferolu (np.: octan **23**), jak też wolny α -tokoferol⁷⁷. Wodorobursztynian

α -tokoferolu (**24**) określany jako „*redox-silent*”, należy do grupy związków zwanych mitokanami⁷⁸, które działają poprzez destabilizację mitochondriów⁷⁹.

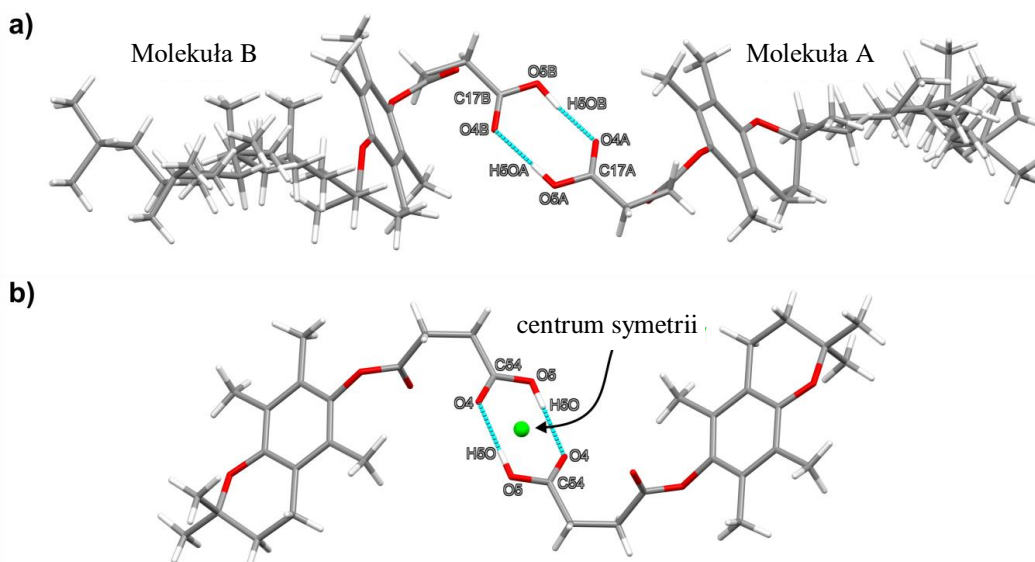
Należy zaznaczyć, że nadal pozostaje niejasnym, dlaczego w wyniku estryfikacji grupy hydroksylowej w α -tokoferolu kwasem bursztynowym uzyskuje się pochodną o tak znacznej aktywności przeciwnowotworowej.



Rys. 5. Struktury XRD: a) kwaśnego bursztynianu α -tokoferolu **24** cząsteczka A i B, b) kwaśnego bursztynianu chroman-6-olu **26**.

Celem pracy [H-4] było zbadanie właściwości strukturalnych bursztynianów α -tokoferolu (**24**) oraz 2,2,5,7,8-pentametylochroman-6-olu, (**26**). Uzyskane wyniki dostarczają nowych danych do pełniejszego poznania mechanizmu biologicznego działania kwaśnego bursztynianu α -tokoferolu. Dokonałem również porównania właściwości strukturalnych wolnego α -tokoferolu (**1**) z jego octanem **23** i octanem chroman-6-olu **25**. Po raz pierwszy przedstawiłem niepublikowaną wcześniej strukturę krystaliczną bursztynianu α -tokoferolu (**24**, CCDC: 1560507) która jest pierwszą strukturą krystaliczną zawierającą pełny układ α -tokoferolu. Kwaśny bursztynian α -tokoferolu **24** krystalizował w grupie przestrzennej C2, a w wyniku pomiaru dokonanego w temp. 100K uzyskana została struktura krystaliczna z dokładnością 97.2% przy końcowych indeksach *R1* i *R2* odpowiednio 0.0474 i 0.1102. W przypadku kwaśnego bursztynianu α -tokoferolu (**24**) stwierdziłem, że asymetryczną część komórki elementarnej tworzą dwie molekuly ($Z'=2$), natomiast w kwaśnym bursztynianie chroman-6-olu (**26**) $Z' = 1$ (Rys 5). Porównując dane krystalograficzne (długości wiązań, kąty między wiązaniami) w obrębie pierścienia arylowego w bursztynianach **24** i **26** zaobserwowałem znaczne zniekształcenie układu aromatycznego. Wiązania: C4a-C8a, C4a-C5 i C8-C8a były dłuższe (powyżej 1.40Å)

w porównaniu do skróconych: C5-C6 i C6-C7 (poniżej 1.39Å). Zróznicowane były również wartości kątów wewnętrznych w pierścieniu aromatycznym np. *ipso*-C6 w **24** wynosił 122.5°, podczas gdy wartości kątów: C4a-C5-C6, C6-C7-C8 i C7-C8-C8a były znacznie mniejsze (117-118°).



Rys. 6. Struktury dimeryczne w sieci krystalicznej: a) wodorobursztynianu α -tokoferolu (**24**), b) wodorobursztynianu chroman-6-olu (**26**).

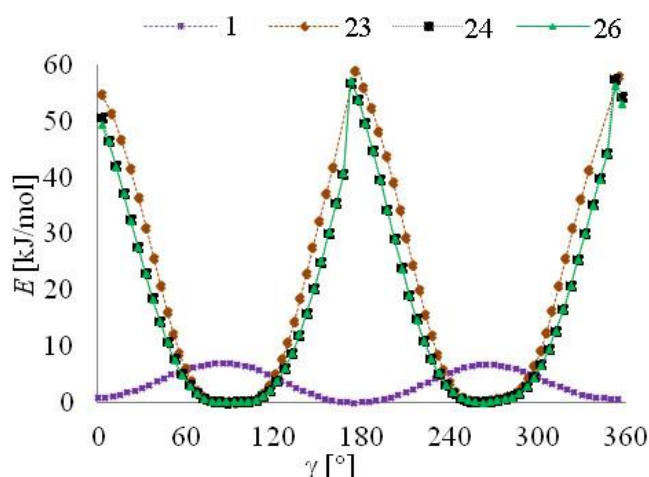
Zgodnie z danymi literaturowymi szacunkowe wartości kąta θ (C4a-C8a-O1-C2), związanego z wysoką aktywnością antyoksydacyjną α -, β -, γ - i δ -tokoferoli wynoszą odpowiednio: 21°, 21.4°, 18.9° i 20.2°¹. Porównując wartość obliczoną teoretycznie dla *RRR*- α -tokoferolu (**1**) z uzyskanymi eksperymentalnie dla wodorobursztynianu *RRR*- α -tokoferolu (**24**) stwierdziłem, że w bursztynianie **24** kąt θ jest znacznie większy i wynosi 28.4° i 24.0°, odpowiednio w strukturach **24A** i **24B**. Zaobserwowałem, że strukturę krystaliczną bursztynianów **24** i **26** stabilizuje sieć silnych międzycząsteczkowych wiązań wodorowych pomiędzy grupami karboksylowymi o długościach rzędu 1.6-1.7Å (Tabela 3).

Tabela3. Międzycząsteczkowe wiązanie wodorowe (Å, °) w bursztynianach **24** i **26**.

	D-H \cdots A	(D-H) [Å]	(H \cdots A) [Å]	(D \cdots A) [Å]	Kąt D-H \cdots A [°]
24	O5A-H5OA \cdots O4B	0.92(5)	1.74(5)	2.657(4)	1.77(4)
	O5B-H5OB \cdots O4A	0.98(5)	1.65(6)	2.628(4)	1.74(5)
26	O5-H5O \cdots O4	0.89(2)	1.76(2)	2.647(1)	1.75(2)

Obserwowane w bursztynianie **24** asymetryczne struktury dimeryczne złożone były z konformacyjnie nierównocennych cząsteczek **24A** i **24B** (Rys. 6a), które w sieci krystalicznej powtarzają się cyklicznie tworząc kolumny molekuł wzdłuż osi krystalograficznej b. Natomiast w bursztynianie **26**, powstające symetryczne dimery (Fig 6b) powtarzają się cyklicznie w sieci krystalicznej wzdłuż osi a.

Geometrię α -tokoferolu (**1**) oraz estrów **23-26** (Schemat 4) były badane również metodą DFT z funkcjonałem B3LYP 31G(d,p). Elektrostatyczne efekty rozpuszczalnika modelowano za pomocą modelu CPCM (*ang. conductor polarizable calculation model*), dostępnego w programie Gaussian09. Analizę populacyjną wykonano metodą naturalnych orbitali atomowych (*ang. natural bond orbital method*^{80,81}) na poziomie B3LYP/6-31G(d,p)/CPCM z wykorzystaniem programu NBO, dostępnego w programie Gaussian09. Wpływ rotacji podstawnika w C-6 na energię cząsteczki optymalizowano na poziomie CPCM/B3LYP/6-31g(d,p). Skany relaksacyjne (*ang. relaxed scan*) wykonywano w rozdzielczości 5° względem wartości kąta γ (C5-C6-O2-C9)^v. Uzyskane profile energetyczne przedstawia Rysunek 7. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazałem, że profil energii dla α -tokoferolu ($E_{(max)}$ dla $\gamma = 0^\circ$ i 180°) był inny niż pochodnych estrowych ($E_{(max)}$ dla $\gamma = 90^\circ$ i 270°). Określiłem również wartości bariery rotacji ($E_{(max)}-E_{(min)}$), która w octanie **23** wynosiła 59 kJ/mol, natomiast w bursztynianach **24** i **26** około 57 kJ/mol, podczas gdy dla wolnego α -tokoferolu (**1**) wynosiła zaledwie 7 kJ/mol.

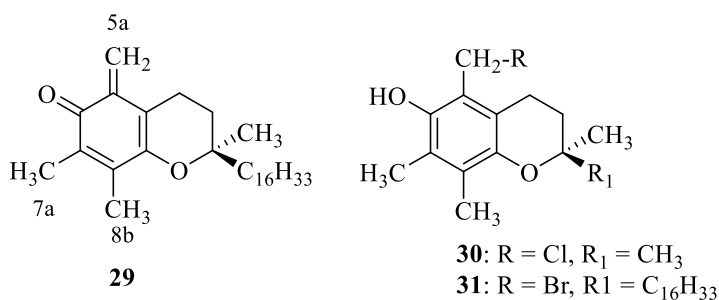


Rys. 7. Zmiany energii w pochodnych **1**, **23**, **24** i **26** [kJ/mol] w zależności od wartości kąta torsyjnego γ [°].

^v - kąt pomiędzy węglami aromatycznymi C5 i C6, atomem tlenu O2 i karbonylowym atomem węgla C9.

W oparciu o uzyskane wyniki zauważyłem znaczący wpływ rotacji podstawnika w pozycji C-6 na dynamikę pierścienia heterocyklicznego, przejawiającą się w zmianie wartości kąta θ ($\theta_{\max} - \theta_{\min} = 1.6^\circ$ dla α -tokoferolu (**1**) i 3.5° dla estrów **23** i **24**). Należy podkreślić, że obserwowane zmiany wartości kąta θ są znacznie mniejsze, niż te opisane wcześniej przez Maciejewską i Dzioka (ok. 20°) dla octanu chroman-6-olu (**25**)⁵⁹. Niewątpliwym niedociągnięciem przeprowadzonych obliczeń jest ich realizacja na stosunkowo niskim poziomie teorii (metoda PM3), ponadto uzyskane skany wykonywano bez relaksacji orbitalnej. W przypadku obliczeń opisanych w pracy [H-4] zastosowana została dobrze sprawdzona w tego typu obliczeniach metoda CPCM-B3LYP/6-31g(d,p) oraz obliczenia prowadzono przy pełnej relaksacji skanów.

Z danych literaturowych wynika, że układ 2,5,7,8-tetrametylochroman-6-olowy wykazuje wysoką regioselektywność w reakcjach utleniania czy substytucji elektrofilowej⁸². Wykazano, że w rozpuszczalnikach aprotycznych (heksan, CCl_4) utlenianie α -tokoferolu (**1**) prowadzi do powstania szeregu produktów typu spirodimerów i spirotrimerów. Stwierdzono, że reakcja przebiega poprzez stadium pośredniej struktury chinometrydowej (**29**, *quinone 5-methide*), której powstawanie w warunkach reakcji wykazano za pomocą adduktów Dielsa-Aldera ze styrenem lub tetracyjanoetylenem⁸³. Wykazano również, że struktura chinometrydowa (**29**) powstaje regioselektywnie z udziałem grupy metylowej w pozycji C5a, podczas gdy analogiczna struktura z udziałem grupy metylowej w pozycji C7a tworzy się w ilości poniżej 3%⁸⁴⁻⁸⁶. Przyczyny obserwowanej regioselektywności wynikają w głównej mierze z różnej gęstości spinowej na grupach metylowych, wyższej dla C5a, a niższej dla C7a, co wykazano metodą spektroskopii ESR (*electron spin resonance*)^{87,88}.



Schemat 5. Struktura *ortho*-chinometrydu (**29**), 5a-chlorochroman-6-olu oraz 5a-bromo- α -tokoferolu (**31**).

W starszych pozycjach literaturowych regioselektywność utleniania α -tokoferolu (**1**) do *ortho*-chinometrydu **29** wyjaśniano przy pomocy niejednoznacznego „efektu Millsa-Nixona”^{89,90}. W ostatnich latach efekt ten został wyjaśniony za pomocą obliczeń

teoretycznych (B3LYP/6-31G*) w ujęciu teorii SIBL (*Strain-Induced Bond Localization*)⁹¹. Wyższą reaktywność grupy metylowej C-5a obserwowano również w trakcie chlorowcowania chroman-6-olu (**12**) za pomocą Cl₂, SOCl₂, SO₂Cl₂ lub PCl₅ z utworzeniem 5a-chloropentametylochroman-6-olu (**30**)⁹², bromowania α-tokoferolu (**1**) za pomocą Br₂ w heksanie prowadzącego do 5a-bromo-α-tokoferolu (**31**)⁹³, czy też utleniania nadtlutkiem benzoilu lub acetylu^{94,95}. Regioselektywność reakcji z udziałem grupy metylowej C-5a w porównaniu z C-7a obserwowano również w estrowych pochodnych α-tokoferolu i chroman-6-olu. Nitrowanie octanu lub bursztynianu α-tokoferolu (odpowiednio **23** i **24**) w kwasie octowym, podobnie jak bromowanie octanu **23** za pomocą Br₂O (generowanego *in situ* z Br₂ i HgO) prowadzi selektywnie, odpowiednio do pochodnych 5a-nitro^{96,97} oraz 5a-bromo⁹⁸, z zachowaniem funkcji estrowej. Interesujących informacji dotyczących reaktywności grup metylowych C5a, 7a i 8b dostarczyły badania octanu chroman-6-olu za pomocą spektroskopii ¹³C NMR z zastosowaniem rodnika TMPN (2,2,6,6-tetramethylpiperidine nitroxide)⁹⁹. Wykazano, że pozytywna gęstość spinowa (*positive spin density*) jest generowana na atomach węgla C7a oraz C8b wykazujących na znacząco wyższe właściwości elektrono-akceptorowe w porównaniu do grupy metylowej C5a⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Do wyjaśnienia wyższej reaktywności grupy metylowej C5a w porównaniu z C7a dla poszczególnych atomów w strukturze α-tokoferolu (**1**) oraz estrów **23-26** (Schemat 4), zostały wyznaczone wartości funkcji Fukui. Zgodnie z danymi literaturowymi, funkcja ta jest dobrym narzędziem przeznaczonym do oceny reaktywności i selektywności reaktywnych miejsc w molekułach¹⁰¹. W ogólnym uproszczeniu, wartości funkcji Fukui zawęża się do opisu pojedynczych atomów w cząsteczce¹⁰².

Funkcje Fukui definiujemy, jako:

$$f(r) = \frac{\partial \rho(r)}{\partial N}$$

gdzie: $\rho(r)$ - gęstość elektronowa, N - liczba elektronów, r - potencjały zewnętrzne wywierane przez jądro.

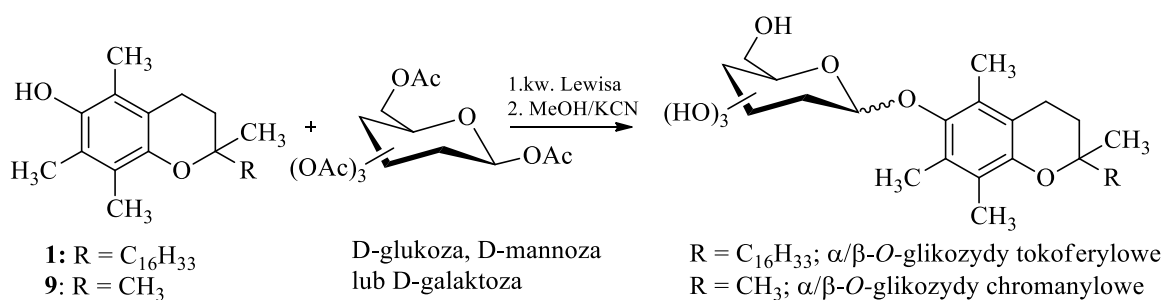
Funkcja Fukui jest lokalnym deskryptorem reaktywności, który wskazuje obszary w indywiduum chemicznym o dużej podatności chmury elektronowej na deformację po przyłączeniu lub oddaniu elektronów przez molekułę¹⁰³. W pracy [H-4] wykorzystałem skrócone funkcje Fukui f^- lub f^+ i f^2 (*condensed or atomic Fukui functions*) opisujące pojedyncze atomy, gdzie obszary o wysokich wartościach $f^-(r)$ lub $f^+(r)$ odpowiadają miejscom zdolnym do oddania lub przyjęcia elektronu w reakcji odpowiednio z elektrofilem

lub nukleofilem. W badaniach wykorzystałem również podwójne deskryptory funkcji Fukui (*Fukui function dual descriptor*, $f^2(r)$), których negatywne wartości $f^2(r)$ odpowiadają miejscom podatnym na oddawanie elektronów (podobne jak duże wartości $f^-(r)$), a wartości dodatnie $f^2(r)$ odpowiadają miejscom zdolnym do przyjmowania elektronów (podobnie jak $f^+(r)$). Zauważyłem, że rozmieszczenie miejsc elektrofilowych w związkach **1**, **23**, **24** i **26** jest podobne. Zlokalizowane są one głównie na atomach tlenu O1 i O2, a także na atomach węgla C6, C8a, C8 i C4a. Ze względu na czynniki steryczne (pierścień heterocykliczny, grupy metylowe) reaktywność atomów węgla C6 i C8a może być znacznie ograniczona. Natomiast miejsca podatne na atak nukleofilowy (wysokie wartości $f^+(r)$ i dodatnie $f^2(r)$) głównie były zlokalizowane na atomach węgla C7, C4a, C8 i C5. W cząsteczce α -tokoferolu podatność na atak nukleofilowy malała w szeregu (C7>C4a>C5C8>C8a>C6), natomiast w bursztynianie **24** (C5>C8>C4a>C7>C4>C8a). W oparciu o uzyskane dane wykazałem, że obserwowane różnice pomiędzy α -tokoferolem (**1**) i jego estrami **23** i **24** wynikają głównie z różnej orientacji niewiążących par elektronowych na atomie tlenu O2 i ich oddziaływania z elektronami π pierścienia aromatycznego.

Terapeutyczne zastosowanie witaminy E jest znacznie ograniczone z uwagi na jej lipofilowy charakter (niska rozpuszczalność w wodzie i płynach ustrojowych) oraz ograniczoną wchłanianiałość w jelicie cienkim z pożywienia (25 - 75%). Jednym ze sposobów zwiększania biodostępności witaminy E jest jej chemiczne przekształcanie w formę amfifilowego proleku o znacznie większej rozpuszczalności i biodostępności. Rozpad proleku (*in vivo*) powinien zachodzić z wydzieleniem aktywnej formy witaminy, głównie w miejscu jej biologicznego działania, pod wpływem enzymów lub kwaśnego środowiska¹⁰⁴. W większości przypadków proleki są prostymi pochodnymi aktywnych biologicznie substancji. Najczęściej leki zawierające grupę fenolową funkcjonalizowane są poprzez przekształcenie w pochodne: węglanowe, estrowe, eterowe lub fosforanowe¹⁰⁴.

W przypadku syntezy proleków witaminy E obiecującym podejściem jest połączenie lipofilowej cząsteczki α -tokoferolu (**1**) z hydrofilową resztą cukrową (glukoza, mannoza, galaktoza). Uzyskiwane glikokoniugaty, w porównaniu do wyjściowego α -tokoferolu, winny wykazywać wysoką amfifilowość oraz charakteryzować się większą biodostępnością i przenikalnością przez bariery biologiczne (np. krew-mózg). Wśród otrzymywanych przede wszystkim glikokoniugatów były *O*-glikozydowe pochodne α -tokoferolu oraz chroman-6-olu^{105,106} (Schemat 6). Właściwości fizykochemiczne uzyskanych α - i β -*O*-glikozydów badałem z wykorzystaniem technik ^1H i ^{13}C NMR w roztworze oraz ^{13}C NMR w fazie stałej

(CPMAS), wspomaganych obliczeniami teoretycznymi. Wyniki tych badań zostały opublikowane w szeregu prac, których jestem współautorem^{57,107,108}.



kw. Lewisa = Et₂OxBF₃, ZnCl₂, SnCl₄

Schemat 6. Schemat syntezy *O*-glikozydów witaminy E.

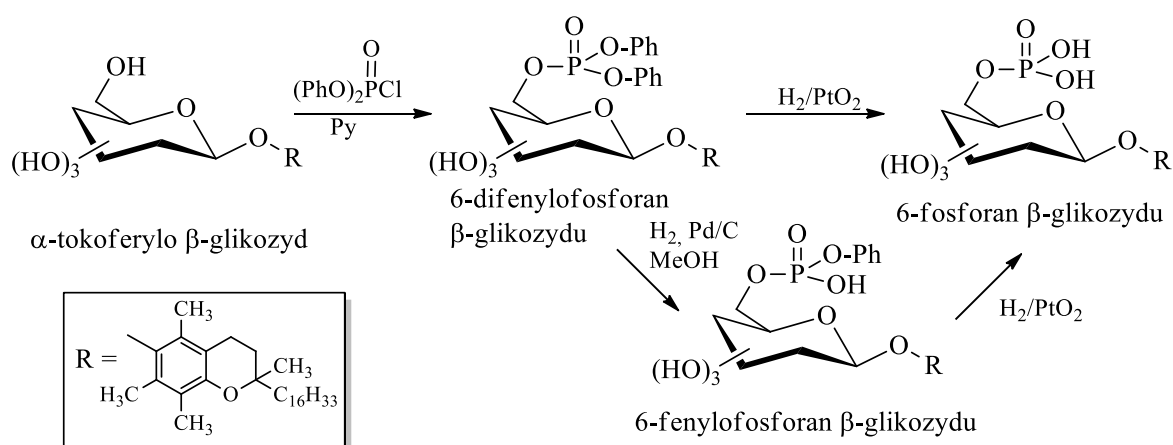
Otrzymane *O*-glikozydy witaminy E były poddawane testom biologicznym w celu określenia trwałości wiązania *O*-glikozydowego wobec glikozydaz zawartych w homogenatach wybranych tkanek zwierzęcych. Badania przeprowadziłem przy współpracy z prof. K. Zwierzem z Białostockiego Uniwersytetu Medycznego oraz prof. M. Józwickiem z Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie. Uzyskane rezultaty zostały opublikowane w serii prac, których również byłem współautorem^{109–111}.

Szczególnie obiecujące były efekty działania promieniochronnego β-glikozydu α-tokoferolu. Badania wykonałem przy współpracy z Kliniką Dermatologii Białostockiego Uniwersytetu Medycznego (prof. Waczesław Niczyporuk). Stwierdziłem, że stosowany w badaniach β-glikozyd α-tokoferolu wykazywał wysoką skuteczność działania ochronnego skóry, z uwagi na lepszą penetrację tkanki oraz przedłużony czas działania¹¹². Glikozydy α-tokoferolu badano również za pomocą technik fluorescencyjnych w aspekcie ich oddziaływania z modelowymi błonami liposomalnymi. Badania te wykonano przy współpracy z prof. Krzysztofem Polewskim z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Wyniki badań zostały opublikowane w szeregu prac, których jestem współautorem^{113–115}. Niestety, otrzymane *O*-glikozydy tokoferolu wykazywały zbyt małą rozpuszczalność w płynach ustrojowych oraz zbyt dużą trwałość wobec glikozydaz¹¹⁶. Z uwagi na to, prowadziłem prace nad zwiększeniem polarności syntetyzowanych *O*-glikozydów tokoferylowych, jak też nad otrzymywaniem nowych, łatwiej hydrolizujących glikokoniugatów α-tokoferolu. Wykazałem, że znaczny wzrost rozpuszczalności *O*-glikozydów α-tokoferolu można uzyskać w wyniku wprowadzenia grupy fosforanowej do reszty cukrowej w pozycji C6 (Schemat 7). Z kolei jako nowe pochodne, łatwiej

ulegające hydrolizie z uwolnieniem cząsteczki α -tokoferolu, otrzymałem 1,2-ortoestry cukrowo-tokoferylowe (Schemat 8) oraz glikokoniugaty z łącznikiem pięcio-węglowym (Schemat 10).

[H-5] P. Wałęjko, S. Witkowski, "Selective removal of phenyl group from alkyl diphenyl phosphates", *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, 118–122 (2017). DOI: 10.1016/j.jscs.2016.05.002

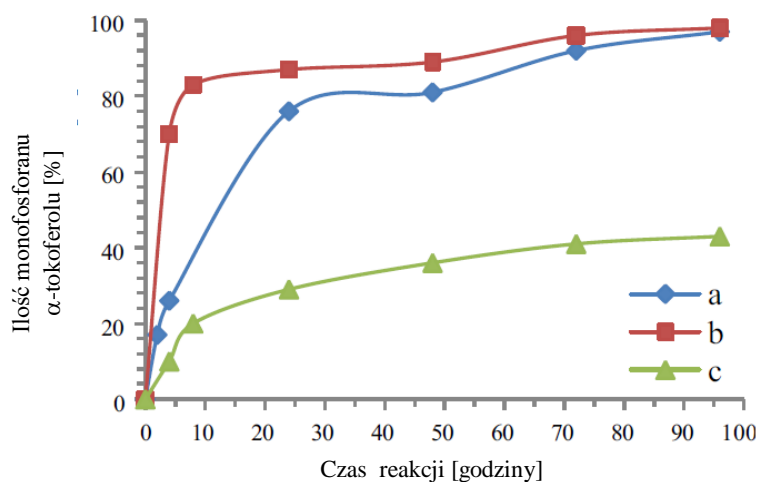
Celem prowadzonych badań było przekształcenie *O*-glikozydów α -tokoferolu w ich bardziej polarne pochodne w efekcie fosforylacji pierwszorzędowej grupy hydroksylowej C6"-OH w części cukrowej. Reakcje fosforylowania przeprowadzałem działając na nieblokowane *O*-glikozydy aryłowe difenylchlorofosforanem ((PhO)₂P(O)Cl) w bezwodnej pirydynie. W standardowych warunkach odblokowywania (H₂/PtO₂) z powstałego difenylfosforanu usuwane są dwie grupy fenyłowe z utworzeniem 6-fosforanu β -glikozydowego. W trakcie badań opracowałem nieopisaną w literaturze metodę selektywnego usuwania tylko jednej grupy fenyłowej z alkilodifenylfosforanów (Schemat 7). Należy podkreślić, że tego typu wydajne i selektywne przekształcenie zachodzi w bardzo łagodnych warunkach (H₂, 5% Pd/C) i wydaje się być dobrą alternatywą dla metod tradycyjnie stosowanych w syntezie mieszanych dwupodstawionych fosforanów.



Schemat 7. Schemat otrzymywania 6-fosforanów *O*-glikozydów.

W oparciu o standardową metodę fosforylowania ((Ph₂O)₂POCl/Py¹¹⁷) uzyskałem szereg difenylfosforanów z handlowo dostępnych alkoholi (mentol, cholesterol) oraz zsyntetyzowanych wcześniej *O*-glikozydów: metylu, fenyłu oraz chromanyłu. W wyniku

przeprowadzonych prób zoptymalizowałem warunki reakcji (H_2 , 5% Pd/C, MeOH), a także zbadałem wpływ środowiska reakcji (pH) na przebieg procesu, co ilustruje Rysunek 8.

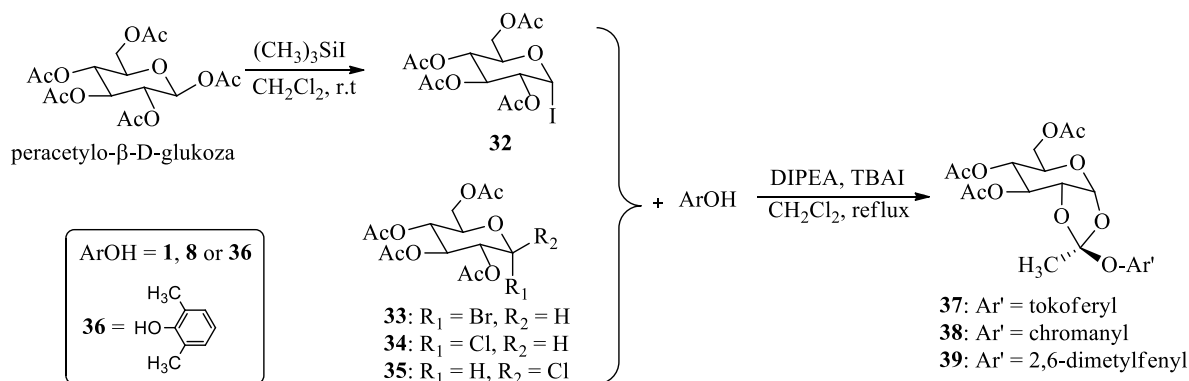


Rys. 8. Wpływ warunków reakcji na przebieg monodefenylowania: a) 5% Pd/C, MeOH, b) 5% Pd/C, $Et_3N/MeOH$ i c) 5% Pd/C, $AcOH/MeOH$.

W efekcie, opracowałem ogólną, prostą procedurę pozwalającą na selektywne usuwanie jednej reszty fenylowej w difenylfosforanach alkilowych. Otrzymane tą drogą monofenylfosforany mogą znaleźć zastosowanie w syntezie mieszanych fosforanów alkilowych.

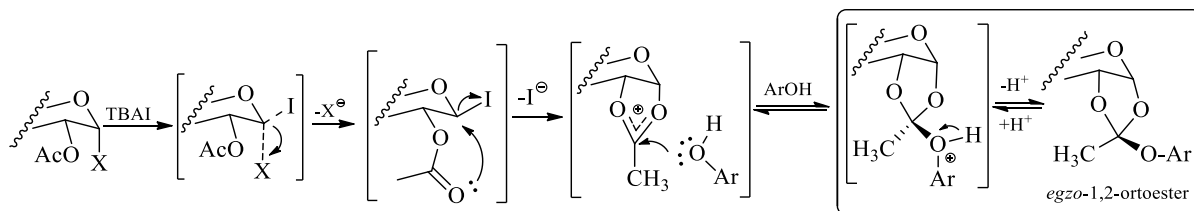
[H-6] P. Wałęjko, A. Baj, “The synthesis of vitamin E sugar 1,2-ortho esters”, *Monatshefte für Chemie*, 150, 275-282 (2019). DOI 10.1007/s00706-018-2332-6.

Celem tej pracy była synteza 1,2-ortoestrów cukrowo-tokoferylowych (**37-39**) z łatwo dostępnych anomerycznych halogenków cukrowych (**32-35**). W pracy [H-6] wykazałem, że generowane *in situ* α-jodki cukrowe (**32**) ulegają efektywnie reakcji z fenolami wobec DIPEA i TBAI, z utworzeniem pochodnych ortoestrowych **37-39** (Schemat 9). Zaobserwowałem, że 1,2-ortoestry cukrowo-tokoferylowe **37-39** można uzyskać wydajnie z bardziej trwałych acetylowanych anomerycznych halogenków cukrowych (α-bromku **33** oraz α- i β-chlorków **34** i **35**). W oparciu o dane spektroskopowe 1H i ^{13}C NMR uzyskanych ortoestrów wykazałem, że w warunkach reakcji powstają selektywnie jedynie *egzo*-ortoestry **37-39**¹¹⁸.



Schemat 9. Otrzymywanie 1,2-ortoestrów cukrowych (**37-39**) z halogenków cukrowych **32-35**.

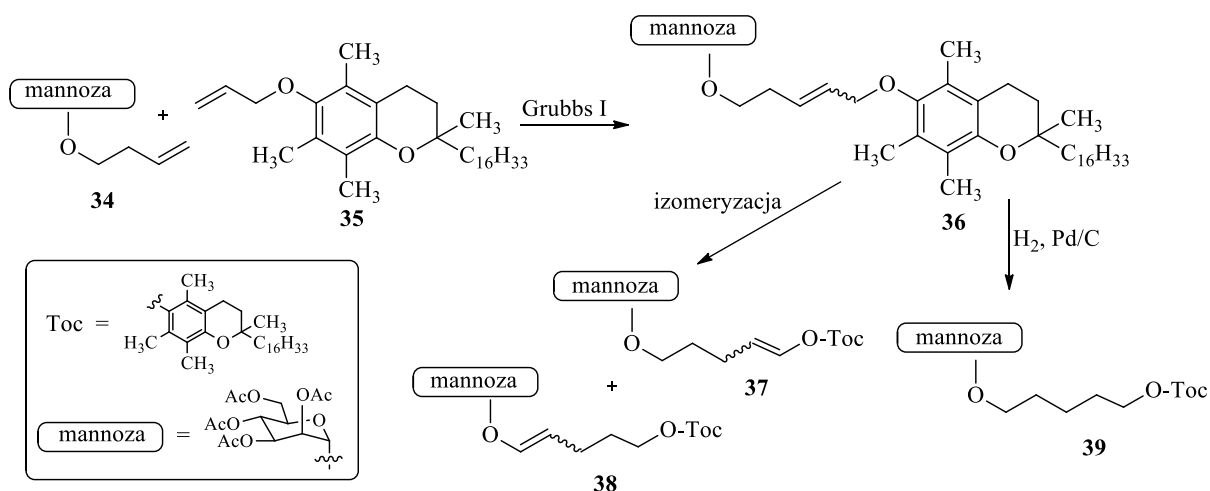
Na podstawie reakcji prowadzonych z udziałem anomerycznych jodków, bromków i chlorków cukrowych (**32-35**) z α -tokoferolem (**1**), chroman-6-olem (**8**) oraz 2,6-dimetylofenolem (**36**) wobec TBAI, jak i przy jego braku zaproponowałem mechanizm powstawania 1,2-ortoestrów cukrowo-arylowych **37-39**. Przypuszczalnie kluczowym etapem reakcji jest powstawanie jonu acyloksoniowego (*acyloxonium ion*), w wyniku rozerwania wiązania C-X z równoczesnym atakiem niewiążących par elektronowych C2-octanowego karbonylowego atomu tlenu na anomeryczny atom C1^{119,120}. Zaobserwowałem również, że anomeryczne β -halogenki są bardziej podatne na rozpad wiązania C-X w porównaniu do α -anomerów oraz że szybkość i wydajność reakcji zależy od tempa wymiany chlorowca w C1 z utworzeniem bardziej reaktywnego β -jodku **32**, co ilustruje Schemat 9.



Schemat 9. Proponowany mechanizm powstawania *exo*-1,2-ortoestrów cukrowo-arylowych.

Opisana metoda pozwala na wydajną syntezę *exo*-1,2-ortoestrów tokoferylowych. Zgodnie z oczekiwaniami uzyskane ortoestry wykazywały wyższą amfifilowość w porównaniu do α -tokoferolu (**1**) oraz znacznie mniejszą trwałość w porównaniu z *O*-glikozydami α -tokoferolu. Właściwości te stwarzają możliwości ich zastosowania jako potencjalnych proleków witaminy E.

Badane *O*-glikozydy witaminy E (Schemat 6), przypuszczalnie z powodu dużej zawady przestrzennej wokół wiązania glikozydowego, wykazywały znaczną trwałość wobec endogennych glikozydaz^{109,110,116}, co stanowi poważne utrudnienie w zastosowaniu ich jako potencjalnych proleków.



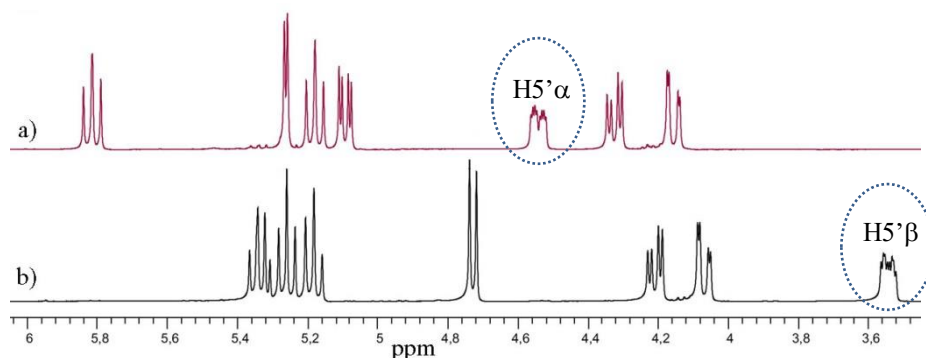
Schemat 10. Schemat otrzymywania glikokoniugatów α -tokoferolu 42-45 z łącznikiem 5-węglowym.

Z tego powodu podjąłem próbę syntezy proleków witaminy E, w których transportująca reszta cukrowa byłaby połączona z cząsteczką α -tokoferolu (1) za pomocą odpowiedniego łącznika. Takie oddalenie reszty cukrowej od reszty tokoferylowej wydatnie zmniejszyłoby zawadę przestrzenną wokół wiązania glikozydowego. W tego typu glikokoniugatach istotny jest charakter wiązania pomiędzy łącznikiem a resztą arylową. W warunkach syntezy powinno ono być trwałe, natomiast *in vivo* ulegać rozpadowi pod wpływem endogennych enzymów czy też kwaśnego środowiska. Syntezę pochodnych zawierających łącznik pięciowęglowy (alkilowy i alkenyowy) opisałem w pracy [H-7]. Głównym etapem przedstawionych w pracy syntez było metatetyczne połączenie uzyskanych wcześniej: eteru allilowego α -tokoferolu (41) oraz 3-butenylo α -mannopiranozydu (40) wobec katalizatora Grubbsa I-generacji z utworzeniem glikokoniugatu 42. W celu uzyskania połączenia z łatwo hydrolizującym w środowisku kwaśnym łącznikiem (eter enolowy 43) zbadałem możliwości izomeryzacji wiązania C=C w pochodnej 42 (Schemat 10). W wyniku przeprowadzonych reakcji opracowałem efektywną metodę izomeryzacji glikokoniugatu 42 do mieszaniny 43 i 44 za pomocą katalizatorów Grubbsa I lub Hoveydy-Grubbsa II wobec

NaBH₄. W pracy [H-7] otrzymałem nieopisane wcześniej w literaturze glikokoniugaty α -tokoferolu **42-45**. Ponadto, opracowałem nową metodę otrzymywania eteru enolowego α -tokoferolu (**43**) w warunkach reakcji metatezy olefin, łatwo hydrolizującego w środowisku kwaśnym z uwolnieniem cząsteczki α -tokoferolu (**1**).

[H-8] R. B. Nazarski, P. Wałejko and S. Witkowski, "Multi-conformer molecules in solutions: An NMR-based DFT conformational study of two glucopyranosides of vitamin E model compound", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14, 3142 – 3158 (2016). DOI: 10.1039/C5OB01865J

Glikokoniugaty witaminy E wykazywały interesujące właściwości spektroskopowe, zarówno w roztworze jak i w fazie stałej. Przykładowo, pomiędzy widmami ¹H NMR α - i β -glikozydów α -tokoferolu lub chroman-6-olu występują znaczące różnice w kształcie i wartościach przesunięcia chemicznego sygnałów części cukrowej (Rys. 9).



Rys. 9. Fragment widma ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): a) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- α -glukopiranozydu chroman-6-olu (**46 α**) b) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -glukopiranozydu chroman-6-olu (**46 β**).

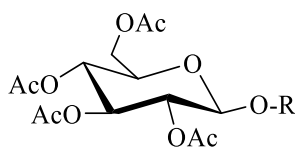
Wstępna analiza konformacyjna wskazywała, że różnice te mogą wynikać z przyjmowania przez resztę cukrową różnych konformacji: β -krzesłowej lub α -skręconej łódki¹⁰⁸. Jednakże koncepcja ta nie znalazła potwierdzenia w uzyskanych później danych XRD dla peracetylo- α -glukozydu chroman-6-olu **46 α** ¹²¹. Z uwagi na rozwój technik obliczeniowych jak i wzrost ich dostępności postanowiłem zagadnienie to zbadać dokładniej.

Jednym z celów założonych w pracy [H-8] było wyjaśnienie obserwowanych różnic w wartościach przesunięcia chemicznego w ¹H NMR pomiędzy sygnałami reszt cukrowych α - i β -glikozydów: α -tokoferolu (**1**), chroman-6-olu (**9**) oraz 2,6-dimetylofenolu (**36**). Szczególnie duże różnice rzędu 1 ppm (Δ H5') pomiędzy sygnałami pochodzącymi od

protonu H5' występowały w α - i β -anomerach ($\Delta_{H5'} = \delta_{H5'\alpha} - \delta_{H5'\beta}$). Na podstawie analizy widm syntezowanych glikozydów wykazałem, że zbliżone wartości $\Delta_{H5'}$ (ok. 1 ppm) można również wyznaczyć dla par α - β -galaktozydów, mannozydów oraz 2-deoksyglukozydów chroman-6-olu. Wykazałem również, że wartość $\Delta_{H5'}$ obniża się wraz ze zmniejszaniem zawady przestrzennej aglikonu (Tabela 4). Uznałem, że dla zrozumienia obserwowanych różnic pomiędzy widmami ^1H NMR α - i β -glikozydów istotnym jest dokładniejsze poznanie właściwości konformacyjnych badanych układów. W tym celu niezbędne jest jak najdokładniejsze odzwierciedlenie obserwowanej w roztworze uśrednionej konformacji, mając na uwadze znaczną labilność części cukrowej. Z uwagi na to, w pracy dokonano pełnej interpretacji widm ^1H i ^{13}C NMR obu anomerów 2,3,4,6-tetraacetylo glikozydów chroman-6-olu (**46 α** i **46 β**), które potraktowałem jako związki modelowe. Na tej podstawie wyznaczyłem również wartości szeregu diagnostycznych stałych sprzężenia $J_{\text{H-H}}$ oraz $J_{\text{C-H}}$.

Tabela 4. Różnice w przesunięciu chemicznym sygnałów H5 α i H5 β w wybranych pochodnych (^1H NMR, 400 MHz).

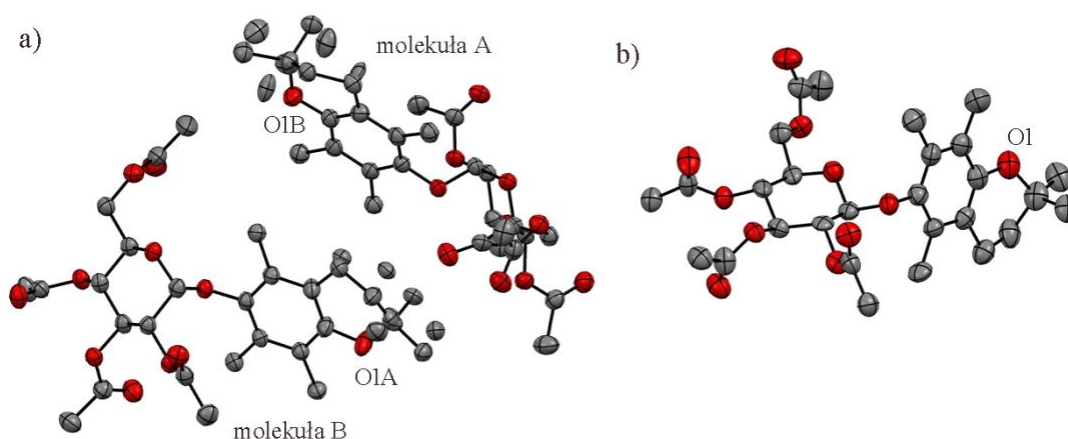
R	$\delta_{\text{H5}\alpha}$	$\delta_{\text{H5}\beta}$	$\Delta_{\text{H5}} = \delta_{\text{H5}\alpha} - \delta_{\text{H5}\beta}$
	[CDCl ₃ , ppm]		[ppm]
C(O)CH ₃	4.06	3.77	0.29
CH ₃	3.97	3.65	0.32
fenyl	4.30	3.86	0.44
2,6-dimetylofenyl	4.52	3.57	0.95
chromanyl	4.54	3.54	1.00
α -tokoferyl	4.56	3.51	1.05



Dogodnym narzędziem do analizy badanych układów są obliczenia DFT (*Density Functional Theory*), pozwalające na wyznaczenie w badanych konformerach teoretycznych wartości stałych ekranowania (σ) oraz ich powiązanie z wartościami przesunięcia chemicznego (δ). Takie podejście wydaje się być celowe w badaniu układów konformacyjnie labilnych, dających w roztworze uśrednione widmo NMR, pochodzące od poszczególnych populacji rotamerów (*population-weighted averaged NMR*). Próby odpowiedzi na te pytania skłoniły mnie do postawienia kolejnego celu pracy, jakim było zbadanie wiarygodności danych obliczeniowych uzyskanych za pomocą kilku wybranych modeli DFT (z uwagi na dostępność oprogramowania i zasobów obliczeniowych). Przeprowadzona analiza porównawcza pozwoliła na znalezienie najodpowiedniejszej metody przewidywania form badanego układu, współlistniejących w równowadze w roztworze. Należy podkreślić, że takie podejście, polegające na zestawieniu danych NMR

oraz niepewności obliczeń DFT dla układów wielokonformacyjnych (*multi-conformational*), dodatkowo w części weryfikowane za pomocą obliczeń MP2, nie było wcześniej publikowane.

Zwyczajowo konformacje *O*-glikozydów opisuje się za pomocą wartości kątów torsyjnych wokół wiązania glikozydowego - φ i ψ , definiowanych, jako: $O5'-C1'-O-C6$ i $C1'-O6-C6-C5$ oraz ω ($O5'-C5'-C6'-O6'$), dotyczącego grupy przy $C6'-OH$. Wartości wymienionych kątów zostały wyznaczone dla uzyskanych niskoenergetycznych konformacji 46α i 46β , a następnie zostały porównane z wartościami obserwowanymi w fazie krystalicznej. Na wstępnym etapie pracy [H-8] dysponowałem jedynie strukturą XRD glukozydu 46α (Rys 10a). W perspektywie dalszych badań istotnym okazało się uzyskanie odpowiedniego do pomiarów X-ray monokryształu β -anomeru (46β). Uzyskana przeze mnie struktura XRD peracetylo- β -D-glukozydu chroman-6-olu (46β) została przedstawiona na Rysunku 10b. Porównując struktury krystaliczne α - i β -anomerów wykazałem, że w obu glukozydach reszta cukrowa przyjmuje względnie sztywną konformację krzesłową (4C_1) z wyraźnie różną orientacją pierścienia arylowego. Na podstawie otrzymanych wyników (obliczenia DFT i dane XRD) wykazałem, że tylko nieliczne z rozpatrywanych rotamerów występują w roztworze, co w głównej mierze wynika z ograniczenia swobody konformacyjnej jedynie do kilku swobodnie rotujących wiązań.

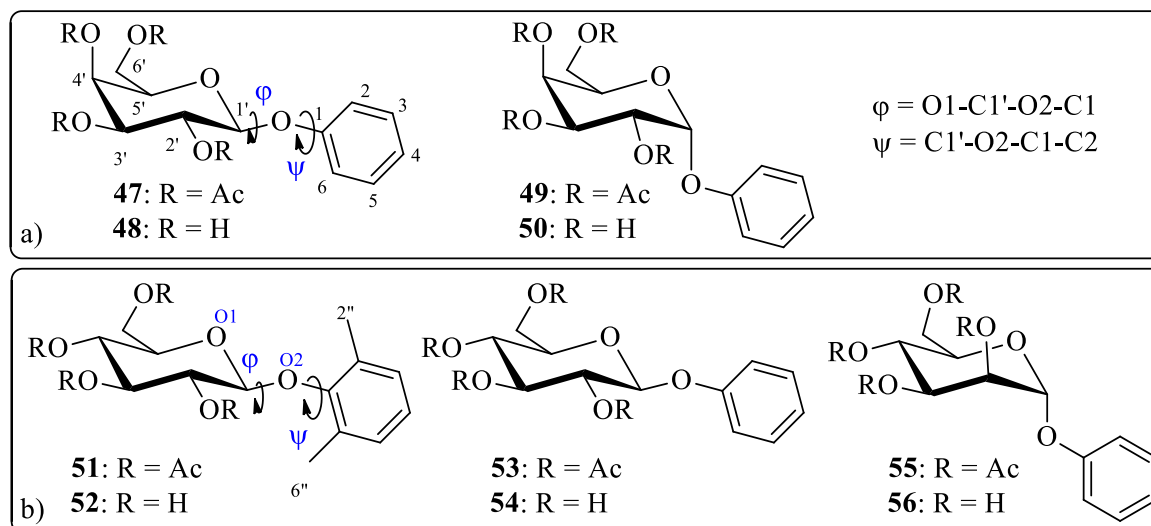


Rys. 10. Struktury XRD: a) peracetylo α -glukozydu chroman-6-olu (46α) oraz b) peracetylo β -glukozydu chroman-6-olu (46β).

Uzyskane metodą GIAO/DFT wartości przesunięć chemicznych δ_H i δ_C oraz wybranych stałych sprzężenia J_{H-H} wyliczonych dla poszczególnych konformerów

α - i β -anomerów porównałem z odpowiednimi danymi uzyskanymi z widm ^1H NMR w roztworze. W efekcie ustaliłem, że duże różnice $\Delta_{\text{H5}'} = \delta_{\text{H5}'\alpha} - \delta_{\text{H5}'\beta}$, obserwowane pomiędzy anomerami glikozydów arylowych (Rys. 9) wynikają w głównej mierze z różnej, wzajemnej orientacji pierścienia aglikonu arylowego i uśrednionej płaszczyzny reszty cukrowej. Przegląd niskoenergetycznych struktur **46 α** i **46 β** wykazał, że protony przy C5' α znajdują się w obrębie odsłaniającej części stożka anizotropowego pierścienia aromatycznego. Ponadto wykazałem, że wartość przesunięcia chemicznego (δ) protonów H5' α - i β - w *O*-glikozydach arylowych o znacznej zawadzie przestrzennej może być stosowana do określenia geometrii na anomerycznym atomie węgla C1.

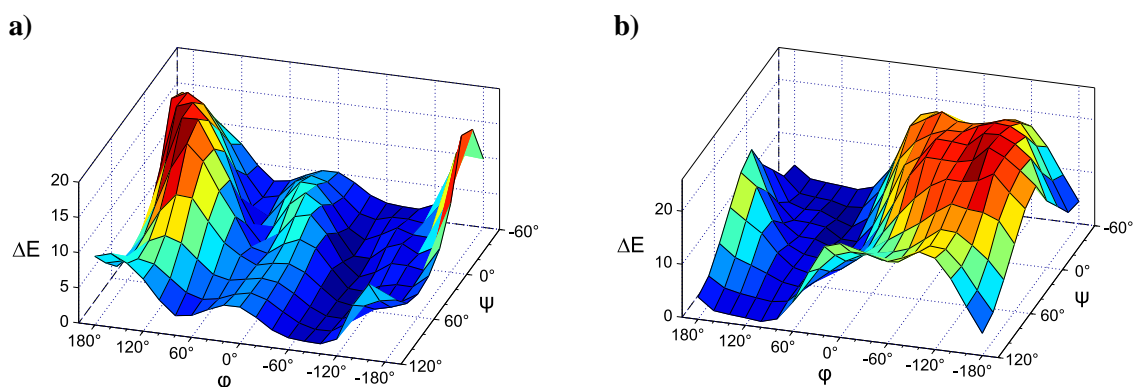
Podstawowym wnioskiem wypływającym z badań konformacyjnych *O*-glikozydów chroman-6-olu [H-8] było stwierdzenie, że na właściwości spektroskopowe badanych układów wpływa przede wszystkim wzajemna orientacja reszty cukrowej i arylowego aglikonu. W celu szerszego zbadania relacji glikon – aglikon otrzymałem szereg modelowych α/β -glikozydów fenolu (glukozydy, galaktozydy, mannozydy) oraz β -glukozyd 2,6-dimetylofenolu (Schemat 11), które poddałem analizie konformacyjnej. Wyniki badań prowadzone za pomocą technik spektroskopii ^1H NMR w roztworze oraz ^{13}C NMR w roztworze i fazie stałej, wspomagane obliczeniami teoretycznymi, opisałem w dwóch pracach wchodzących w skład mojego dorobku [H-9 i H-10].



Schemat 11. Struktury chemiczne badanych glikozydów arylowych: galaktozydów **47-50** b) glukozydów **51-54** i mannozydów **55** i **56**.

[H-9] P. Wałejko, K. Paradowska J. Bukowicki, S. Witkowski, I. Wawer, "Phenyl Galactopyranosides - ^{13}C CPMAS NMR and conformational analysis using genetic algorithm", *Chemical Physics*, 457(1), 43-50 (2015). DOI:10.1016/j.chemphys.2015.05.015

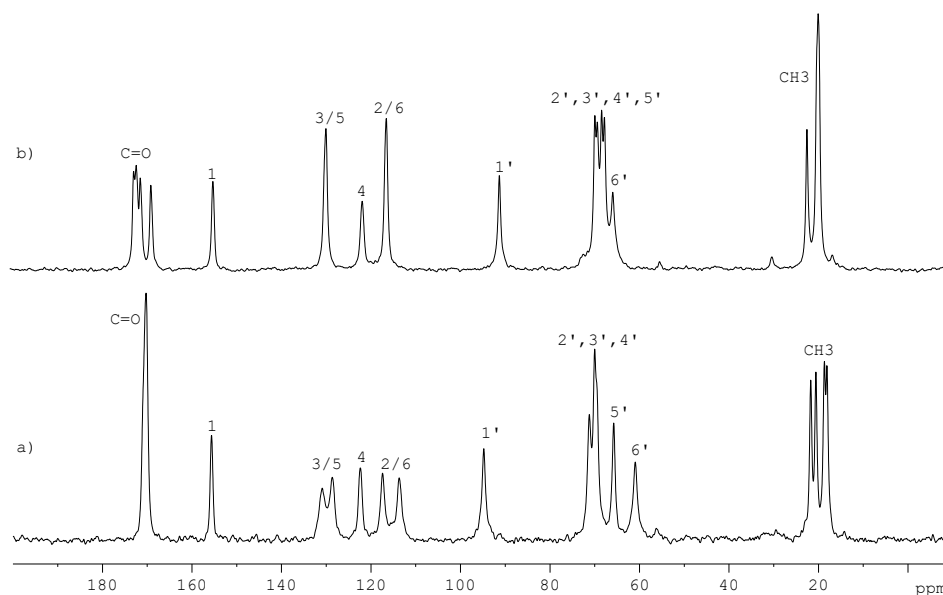
W pierwszej pracy badałem konformacje acetylowanych oraz deacetylowanych α - i β -galaktozydów fenylu **47-50** (Schemat 11a). W badaniach powiązałem dane teoretyczne, obliczone metodą DFT z eksperymentalnymi, uzyskiwanymi za pomocą spektroskopii ^{13}C NMR w roztworze i fazie stałej. Tego typu podejście jest zalecane dla uzyskania wiarygodnych parametrów strukturalnych związków, dla których nie są dostępne dane krystalograficzne. Analiza konformacyjna galaktozydów **47-50** wykonana została metodą Systematycznego Przeszukiwania Wspomaganego Algorytmem Genetycznym (GAAGS, Genetic Algorithm - Assisted Grid Search). Metoda ta pozwoliła na dokładne przeszukiwanie przestrzeni konformacyjnej przy różnych wartościach kątów ϕ i ψ . W efekcie uzyskano mapy ilustrujące zależność energii potencjalnej od wartości kątów torsyjnych ϕ i ψ . Mapy tworzono z zastosowaniem mechaniki molekularnej MMFF94 stosując dwie wartości stałej dielektrycznej: $\epsilon = 1.0$ i 4.0 (Rys. 11) w celu zobrazowania, jak zmniejszenie oddziaływań elektrostatycznych (mniejsza wartość ϵ) wpływa na orientację grup pobocznych. W przypadku galaktozydów **48-50** nie zaobserwowałem znaczącego wpływu zastosowania wyższej wartości stałej dielektrycznej na rodzaj uzyskiwanych niskoenergetycznych konformacji, natomiast w przypadku acetylowanego β -galaktozydu **47** różnice były znaczące.



Rys. 11. Przykładowe mapy energii potencjalnej (kcal/mol) uzyskane metodą MMFF94 przy $\epsilon = 1.0$ dla acetylowanych galaktozydów: a) **47** b) **49**. (ΔE - w stosunku do najniższej obserwowanej wartości energii)

Ponieważ eksperymentalne (^{13}C CPMAS NMR) i teoretyczne (DFT) wartości przesunięcia chemicznego niosą istotne informacje na temat elementów labilnych

konformacyjnie oraz oddziaływań molekularnych dla badanych galaktozydów **47-50**, dokonałem pełnego przypisania sygnałów w widmach ^{13}C NMR w roztworze i fazie stałej. Następnie metodą GIAO DFT(*gauge-independent atomic orbital*) dla zoptymalizowanych energetycznie konformerów zostały wyliczone stałe ekranowania (σ_i , baza funkcyjna B3LYP 6-31+G(d,p)), które przeliczyłem na wartości przesunięcia chemicznego (δ_i), gdzie $\delta_i = \sigma_{\text{TMS}} - \sigma_i$. Na podstawie analizy widm ^{13}C NMR w fazie stałej galaktozydów **47**(β) i **49**(α) wykazałem różny stopień swobody aglikonu arylowego w anomerycznych galaktozydach – swobodną w **47**(β) oraz ograniczoną w **49**(α) (Rys. 12).



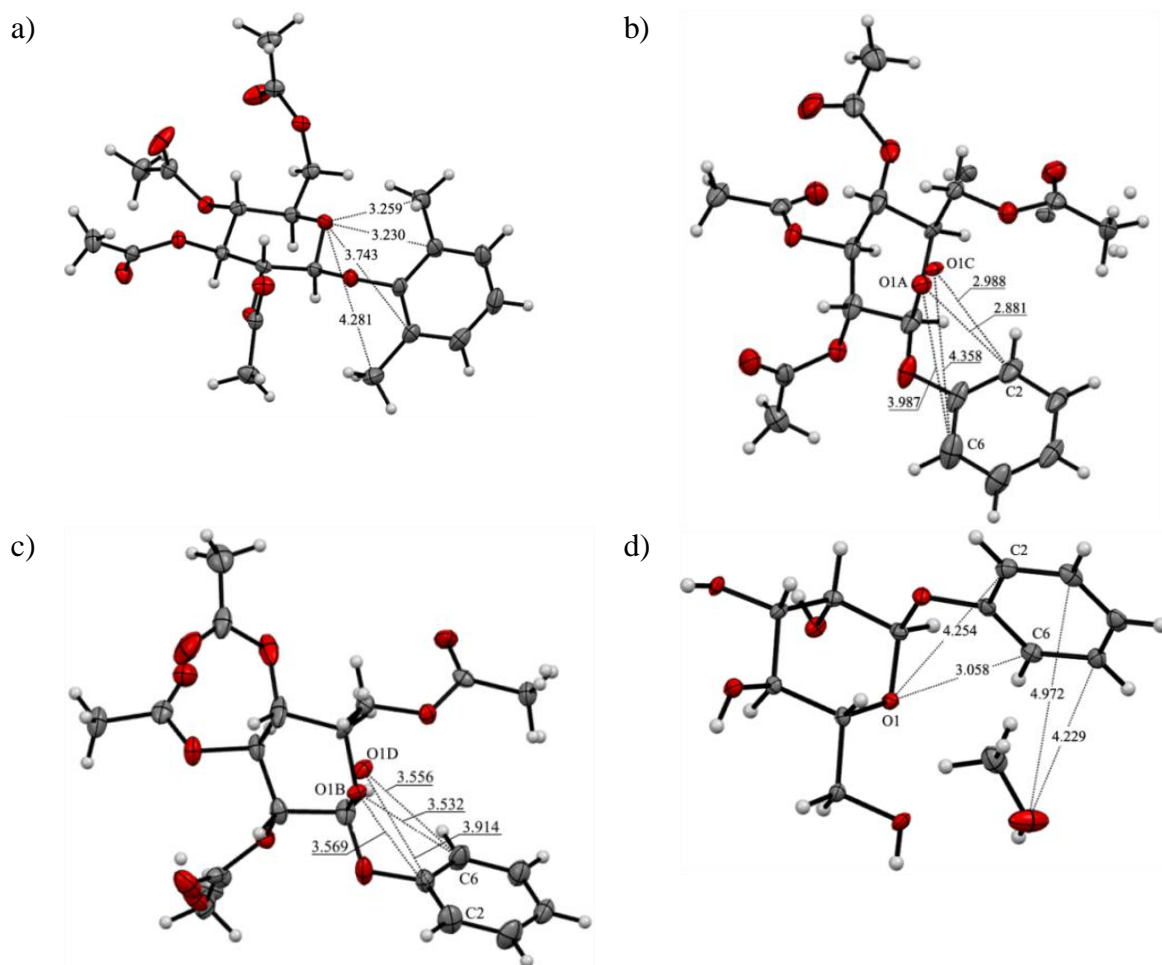
Rys. 12. Widma ^{13}C CPMAS NMR: a) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -D-galaktopiranozydu fenylu (**47**) b) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- α -D-galaktopiranozydu fenylu (**49**).

W oparciu o wyznaczone wartości kątów torsyjnych φ ($\text{O}5'-\text{C}1'-\text{O}-\text{C}6$) i ψ ($\text{C}1'-\text{O}6-\text{C}6-\text{C}5$) w niskoenergetycznych konformacjach **47-50** wykazałem, że z uwagi na zawadę przestrzenną reszta arylova jest „skręcona” w stosunku do uśrednionej płaszczyzny pierścienia piranozowego. W celu zobrazowania wpływu zmian wartości kąta ψ na przesunięcie chemiczne fenylowych atomów węgla (δ) dla konformeru **47B**($_4$), wyznaczona została zależność $f(\psi) = \delta$ (w zakresie -60° do $+120^\circ$). W efekcie wykazałem znaczący wpływ wartości kąta ψ na wartość przesunięcia chemicznego atomów C2 i C6, szczególnie w przypadku C2, którego wartość δ może być wykorzystana, jako wskaźnik stopnia skręcenia pierścienia aromatycznego w stosunku do reszty cukrowej.

Należy podkreślić, że zastosowanie Algorytmu Genetycznego (GA) do analizy konformacyjnej, wykazujących znaczną swobodę konformacyjną galaktozydów **47-50** znacznie skraca czas obliczeniowy oraz obniża wymagania sprzętowe. Przymuszczalnie,

gdyby obliczenia przedstawione w pracy były prowadzone na poziomie mechaniki molekularnej, trwałyby około 200 razy dłużej i wymagałyby zaangażowania znacznie większej mocy obliczeniowej.

[H-10] P. Wałejko, J. Bukowicki, Ł. Dobrzycki, P. Socha, K. Paradowska., “Phenyl glycosides - Solid-State NMR, X-ray diffraction and conformational analysis using genetic algorithm”, *Chemical Physics*, 519, 126-136 (2019).DOI:10.1016/j.chemphys.2018.12.001.



Rys. 13. Struktury XRD: a) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -glukopiranozydu 2,6-dimetylofenylu (**51**) b) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- β -glukopiranozydu fenylu (**53**) - molekula A c) molekula B d) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- α -mannopiranozydu fenylu (**56**) (odległości w Å).

Kontynuując prace nad analizą konformacyjną glikozydów arylowych zsyntetyzowałem β -glukozydy: 2,6-dimetylofenylu (**51** i **52**), fenylu (**53** i **54**), oraz α -mannozydy fenylu (**55** i **56**) (Schemat 11b). Podobnie, jak w przypadku analizowanych poprzednio galaktozydów fenylu **47-50**, skupiłem się na zbadaniu wzajemnej relacji reszty cukrowej oraz pierścienia arylowego. Głównym celem pracy było zbadanie efektów wywoływanych

przez rotację podstawnika arylowego, ograniczoną przez zawadę przestrzenną reszty cukrowej. W pracy zastosowałem metody stosowane wcześniej w analizie konformacyjnej galaktozydów fenylu **47-50** [H-9]. Analiza konformacyjna glikozydów **51-56** wykonana została metodą GAAGS wspomaganą standardową metodą GA (*Genetic Algorithm*), uzyskując mapy zależności energii potencjalnej od wartości kątów torsyjnych φ i ψ dla $\varepsilon = 1.0$ lub 4.0 . Zasadniczo wszystkie badane glikozydy posiadały po dwie niskoenergetyczne konformacje, różniące się głównie wartościami kątów torsyjnych φ i ψ , jedynie dla α - i β -glukozydów 2,6-dimetylofenylu (**51** i **52**) obserwowano obecność trzeciego minimum. Znalezione konformacje poddano analizie GIAO-DFT (B3LYP6-31+G(d,p)) wyznaczając wartości przesunięcia chemicznego (δ_i) względem wartości wyliczonej dla TMS.

Z uwagi na fakt, że analizowane glikozydy **51-56** były ciałami stałymi, dla wszystkich zarejestrowano widma ^{13}C NMR w fazie stałej. Analiza uzyskanych widm wskazywała na swobodną rotację aglikonu w glikozydach **53-55**. Natomiast w mannozydzie **56** (solwat z metanolem) oraz w α - i β -glukozydach 2,6-dimetylofenylu **51** i **52** rotacja reszty arylowej była zahamowana. Podobieństwo niskoenergetycznych struktur uzyskanych metodą DFT do postulowanych w fazie stałej potwierdziłem porównując eksperymentalne wartości przesunięcia chemicznego (CP MAS) z wartościami uzyskanymi metodami obliczeniowymi (δ , GIAO/DFT). W każdym z przypadków uzyskałem współczynnik korelacyjny R^2 powyżej 0.98, co wskazuje na znaczne podobieństwo konformacji obserwowanych w fazie stałej z uzyskanymi metodami obliczeniowymi. W pracy [H-10] dodatkowo uzyskane niskoenergetyczne konformacje glikozydów **51-56** skonfrontowałem z konformacjami uzyskanymi za pomocą XRD dla badanych glikozydów. Rozpoczynając pracę nad tym zagadnieniem dysponowałem zaledwie jedną strukturą XRD glukozydu **54** dostępną w bazie CCDC. Z uwagi na potrzeby omawianej pracy, przygotowałem odpowiedniej jakości monokryształy glukozydów **51** i **53** oraz mannozydu **56** (Rys. 13), dla których określone zostały struktury krystaliczne. Porównanie niskoenergetycznych konformacji glikozydów **51-56**, uzyskanych metodami obliczeniowymi, z uzyskanymi metodą X-ray, wykazało ich duży stopień podobieństwa. W pracy wykazałem, że właściwości spektroskopowe badanych O-glikozydów zależą od wzajemnej orientacji reszty cukrowej i aglikonu arylowego, która jest wypadkową zawady przestrzennej wywieranej przez oba fragmenty (cukier i aglikon).

D) Podsumowanie i dalsze perspektywy pracy badawczej:

Wyniki uzyskane podczas realizacji badań opisanych w publikacjach stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego doprowadziły do poszerzenia wiedzy podstawowej w aspekcie poznawczym i praktycznym dotyczącym: syntezy i właściwości spektroskopowych nowych glikokoniugatów witaminy E, badania efektów sterycznych i elektronowych w układzie 2,2,5,7,8-pentametylochromanu oraz analizy konformacyjnej *O*-glikozydów niepodstawionych, i 2,6-dimetylopodstawionych fenoli. W trakcie realizacji prac opisanych w publikacjach [H1-H10] będących podstawą mojej dysertacji dokonałem następujących osiągnięć:

- ❖ Opracowałem prostą i wydajną metodę syntezy 1-deoksy-1-karba- α -tokoferolu oraz 1-deoksy-1-karba-Troloksu - pochodnych różniących się od α -tokoferolu i Troloxu obecnością tomu węgla w miejsce heterocyklicznego atomu tlenu O1 [H-1].
- ❖ Opracowałem syntezę nowych glikokoniugatów witaminy E o zwiększonej amfifilowości: 1,2-ortoestrów cukrowo-tokoferylowych [H-6], glikokoniugatów z łącznikiem pięciowęglowym [H-7] oraz C6-fosforylowanych glikozydów tokoferylowych [H-5].
- ❖ Opracowałem nową metodę selektywnego usuwania jednej reszty fenylowej w difenylofosforanach alkilowych oraz dokonałem optymalizacji warunków reakcji [H-5].
- ❖ Opracowałem wydajną metodę otrzymywania 1,2-ortoestrów cukrowo-arylowych z anomerycznych bromków i chlorków cukrowych oraz mechanizmu ich powstawania [H-6].
- ❖ Opracowałem metodę izomeryzacji wiązania podwójnego w łączniku 2-pentenowym w glikokoniugacie witaminy E (42) z utworzeniem łącznika 1-pentenowego (eter enolowy α -tokoferolu) [H-7].
- ❖ Uzyskałem szereg nowych, nieopisanych w literaturze struktur krystalicznych (CCDC: 1483208, 148309, 1483210 [H-2], 984656 [H-3], 1560507, 1560510 [H-4], 1451885, 1451886, 1451887 [H-10]).
- ❖ W oparciu o obliczenia DFT, wspartymi obliczeniami NBO, określiłem lokalizacje reaktywnych miejsc w cząsteczce α -tokoferolu oraz jego hemibursztynianie i octanie

poprzez wyznaczenie dla poszczególnych atomów w molekułach wartości funkcji Fukui: $f^-(r)$, $f^+(r)$ i $f^2(r)$ [H-4].

- ❖ Określiłem przyczyny odmiennych właściwości spektroskopowych w fazie stałej form racemicznych i optycznie czynnych Troloxu i jego pochodnych estrowych [H-2].
- ❖ W oparciu o dane eksperymentalne (^{13}C CPMAS NMR) oraz techniki obliczeniowe zbadałem wpływ podstawników elektronoakceptorowych i elektronodonorowych w pozycji C-6 na konformacje układu 2,2,5,7,8-pentametylochromanowego. Wyzaczyłem wartości bariery rotacji dla podstawników: OH, NO₂, NH₂ [H-3] oraz OAc i HOOC(CH₂)₂C(O) [H-4], a także przeanalizowałem wpływ ich rotacji na konformacje pierścienia heterocyklicznego.
- ❖ Na podstawie danych ^1H i ^{13}C NMR oraz obliczeń DFT wyjaśniłem przyczyny różnego ekranowania protonów H5' w α - i β -glukozydach α -tokoferolu i chroman-6-olu [H-8].
- ❖ Wykazałem użyteczność danych pozyskiwanych z widm ^{13}C NMR w fazie stałej w badaniu konformacji pochodnych estrowych Troloxu [H-2] oraz labilnych konformacyjnie glikozydów fenolu [H-10].
- ❖ Wykazałem użyteczność metody Systematycznego Przeszukiwania Wspomaganego Algorytmem Genetycznym (GAAGS, *Genetic Algorithm –Assisted Grid Search*) w poszukiwaniu optymalnych konformacji labilnych konformacyjnie glikozydów fenoli [H-9 i 10].
- ❖ W oparciu o widma ^{13}C NMR w fazie stałej, dane XRD oraz obliczenia teoretyczne GIAO DFT, wyznaczyłem optymalne konformacje dla *O*-glikozydów fenylu oraz 2,6-dimetylofenylu [H-10].

E) Dalsze zamierzenia badawcze:

- ❖ 1-Karbaanalogi α -tokoferolu, Troloxu oraz chroman-6-olu zostaną dokładniej przebadane w aspekcie ich oddziaływania z modelowymi błonami liposomalnymi, co ma na celu dostarczenie nowych danych dotyczących mechanizmu wbudowywania się witaminy E w podwójne warstwy fosfolipidowe. Badania te wykonywane są przy współpracy z prof. Krzysztofem Polewskim z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w ramach kontynuacji naszych wcześniejszych prac^{113–115}.

-
- ❖ 1-Karbaanalogi badane są również w aspekcie ich aktywności antyoksydacyjnej (w odniesieniu do pochodnych macierzystych: α -tokoferolu, Troloksu i chroman-6-olu). Prace są realizowane we współpracy z prof. dr hab. Marią Zamarajewą z Zakładu Biofizyki Instytutu Biologii UwB i będą kontynuowane.
 - ❖ W badaniach spektroskopowych (^1H i ^{13}C NMR) 1-karbaanalogi α -tokoferolu, Troloksu i chromanolu oraz ich pochodne estrowe wykazują interesujące efekty konformacyjne. Efekty te będą badane za pomocą dynamicznej spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR. Przeprowadzone badania wstępne wykazały, że jest to interesujące zagadnienie, które należy rozwijać.
 - ❖ Mając na uwadze wysoką aktywność przeciwnowotworową hemibursztynianu α -tokoferolu, prowadzimy prace nad poszukiwaniem nowych pochodnych witaminy E (estry, etery) o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Wykorzystując metodę dokowania molekularnego w układzie receptor - ligand poszukujemy struktur o przewidywanej wysokiej aktywności biologicznej. Obliczenia teoretyczne prowadzone są we współpracy z prof. Arturem Ratkiewiczem z Zakładu Chemii Teoretycznej Instytutu Chemii UwB, natomiast syntezę wytypowanych pochodnych wykonujemy w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii UwB. Badania biologiczne wykonywane są we współpracy z partnerami czeskimi z grupy prof. Miroslava Strnada (*Laboratory of Growth Regulators, Palacký University, Olomuniec*).
 - ❖ Kontynuowane będą badania nad wpływem podstawników w pozycji C-6 (eterowych) na konformacje układu chromanolowego. Obecnie prowadzone są badania z wykorzystaniem technik obliczeniowych oraz widm NMR rejestrowanych w funkcji temperatury. Pomiary ^1H i ^{13}C NMR wykonywane są w naszym Instytucie (Instytut Chemii UwB), natomiast obliczenia teoretyczne prowadzone są we współpracy z prof. Ryszardem Nazarskim z Zakładu Chemii Teoretycznej i Strukturalnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.
-

Literatura:

- 1 A. Kamal-Eldin, L. Å. Appelqvist, *Lipids*, 1996, 31, 671–701.
- 2 L. Packer, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, 53, 1050S–1055S.
- 3 M. G. Traber, J. Atkinson, *Free Radic. Biol. Med.*, 2007, 43, 4–15.
- 4 R. Brigelius-Flohé, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 305, 737–740.
- 5 J. M. Zingg, *Mol. Aspects Med.*, 2007, 28, 400–422.
- 6 M. G. Traber, D. Rader, R. V. Acuff, R. Ramakrishnan, H. B. Brewer, H. J. Kayden, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 68, 847–853.
- 7 J. Y. Fu, T. T. Htar, L. De Silva, D. Tan, L. H. Chuah, *Molecules*, 2017, 22, 233.
- 8 T. Bitew, C. E. Sveen, B. Heyne and V. Zaremborg, *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 25731–25742.
- 9 J. Neuzil, K. Kågedal, L. Andera, C. Weber, U. T. Brunk, *Apoptosis*, 2002, 7, 179–187.
- 10 S. A. B. E. van Acker, L. M. H. Koymans, A. Bast, *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, 15, 311–328.
- 11 J. M. Zingg, A. Azzi, *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 1113–1133.
- 12 A. Azzi, A. Stocker, *Prog. Lipid Res.*, 2000, 39, 231–255.
- 13 A. Azzi, I. Breyer, M. Feher, R. Ricciarelli, A. Stocker, S. Zimmer and J. M. Zingg, *J. Nutr.*, 2001, 131, 378S–381S.
- 14 R. Ricciarelli, A. Tasinato, S. Clément, N. K. Ozer, D. Boscoboinik, A. Azzi, *Biochem. J.*, 1998, 334, 243–249.
- 15 J. Atkinson, R. F. Epand, R. M. Epand, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 44, 739–764.
- 16 P. J. Quinn, *J. Controlled Release*, 2012, 160, 158–163.
- 17 M. A. Kamal and V. A. Raghunathan, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, 2012, 1818, 2486–2493.
- 18 M. G. Traber, *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, 27, 347–362.
- 19 L. S. Elinder, *Eur. J. Public Health*, 2017, 27, 1118–1118.
- 20 G. Lee, S. Han, *Nutrients*, 2018, 10, 1614.
- 21 K. U. Ingold, G. W. Burton, D. O. Foster, L. Hughes, *Free Radic. Biol. Med.*, 1990, 9, 205–210.
- 22 J. Bardhan, R. Chakraborty, U. Raychaudhuri, *Curr. Pharm. Des.*, 2011, 17, 2196–2205.
- 23 B. B. Aggarwal, C. Sundaram, S. Prasad, R. Kannappan, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, 80, 1613–1631.
- 24 H. Y. Peh, W. S. D. Tan, W. Liao, W. S. F. Wong, *Pharmacol. Ther.*, 2016, 162, 152–169.
- 25 H. Ahsan, A. Ahad, J. Iqbal, W. A. Siddiqui, *Nutr. Metab.*, 2014, 11, 52.
- 26 N. Ramanathan, E. Tan, L. J. Loh, B. S. Soh, W. N. Yap, *Nutr. Metab.*, 2018, 15, 1–15.
- 27 P. Palozza, S. Verdecchia, L. Avanzi, S. Vertuani, S. Serini, A. Iannone, S. Manfredini, *Mol. Cell. Biochem.*, 2006, 287, 21–32.
- 28 L. A. Witting, in *Free Radicals in Biology*, ed. W. A. Pryor, Academic Press, 1980, pp. 295–319.
- 29 I. of Medicine, *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, 2000.
- 30 V. R. Shenoy, *J.Sci.Ind.Res.*, 1995, 54, 357.
- 31 W. Stahl, *Mol. Aspects Med.*, 2002, 23, 39–100.
- 32 A. Stocker, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, 1031, 44–59.
- 33 C. Kiyose, R. Muramatsu, Y. Kameyama, T. Ueda, O. Igarashi, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997, 65, 785–789.
- 34 G. W. Burton, M. G. Traber, R. V. Acuff, D. N. Walters, H. Kayden, L. Hughes, K. U. Ingold, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67, 669–684.
- 35 M. G. Traber, A. Elsner, R. Brigelius-Flohé, *FEBS Lett.*, 1998, 437, 145–148.
- 36 M. G. Traber, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 423, 6–11.
- 37 R. S. Parker, T. J. Sontag, J. E. Swanson, C. C. McCormick, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, 1031, 13–21.
- 38 C. Schneider, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, 49, 7–30.
- 39 K. D. Breese, J. F. Laméthe, C. DeArmitt, *Polym. Degrad. Stab.*, 2000, 70, 89–96.
- 40 G. W. Burton, K. U. Ingold, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1989, 570, 7–22.
- 41 G. W. Burton, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.*, 1986, 19, 194–201.
- 42 G. W. Burton, T. Doba, E. Gabe, L. Hughes, F. L. Lee, L. Prasad, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 7053–7065.
- 43 G. W. Burton, Y. Le Page, E. J. Gabe, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 7791–7792.
- 44 X. Wang, P. J. Quinn, *Prog. Lipid Res.*, 1999, 38, 309–336.
- 45 H. A. Zahalka, B. Robillard, L. Hughes, J. Luszyk, G. W. Burton, E. G. Janzen, Y. Kotake, K. U. Ingold, *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 3739–3745.
- 46 J. Chapelat, U. Hengartner, A. Chougnat, K. Liu, P. Huebbe, G. Rimbach, W.-D. Woggon, *ChemBioChem*, 2011, 12, 118–124.
- 47 A. Baj, P. Wałejko, S. Witkowski, *Monatsh. Chem. - Chem. Mon.*, 2015, 146, 375–382.

-
- 48 P. Wałejko, K. Paradowska, Ł. Szeleszczuk, S. Wojtulewski, A. Baj, *J. Mol. Struct.*, 2018, 1156, 290–300.
- 49 D. K. Stępień, M. K. Cyrański, Ł. Dobrzycki, P. Wałejko, A. Baj, S. Witkowski, K. Paradowska, I. Wawer, *J. Mol. Struct.*, 2014, 1076, 512–517.
- 50 P. Wałejko, Ł. Dobrzycki, A. Ratkiewicz, P. Socha, S. Witkowski, M. K. Cyrański, *J. Saudi Chem. Soc.*, 2019, 23, 365–377.
- 51 P. Wałejko, J. Bukowicki, Ł. Dobrzycki, P. Socha, K. Paradowska, *Chem. Phys.*, 2019, 519, 126–136.
- 52 R. K. Harris, *The Analyst*, 2006, 131, 351.
- 53 R. K. Harris, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2007, 59, 225–239.
- 54 Wallach O., *Liebigs Ann Chem*, 286, 90–143.
- 55 J. Czernek, T. Pawlak, M. J. Potrzebowski, *Chem. Phys. Lett.*, 2012, 527, 31–35.
- 56 M. Górecki, A. Suszczyńska, M. Woźnica, A. Baj, M. Wolniak, M. K. Cyrański, S. Witkowski, J. Frelek, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 2235.
- 57 S. Witkowski, K. Paradowska, I. Wawer, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, 42, 863–869.
- 58 S. Witkowski, R. Anulewicz-Ostrowska, T.M Krygowski, CCDC 152556
- 59 D. Maciejewska, D. Dziok, *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, 2002, 588, 217–222.
- 60 S. Witkowski, D. Maciejewska, I. Wawer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2000, 1471–1476.
- 61 C. S. Yang, G. Li, Z. Yang, *J Food Drug Anal.*, 20, 385–388.
- 62 D. Albanes, O. P. Heinonen, P. R. Taylor, J. Virtamo, B. K. Edwards, M. Rautalahti, A. M. Hartman, J. Palmgren, L. S. Freedman, J. Haapakoski, M. J. Barrett, P. Pietinen, N. Malila, E. Tala, K. Liippo, E. R. Salomaa, J. A. Tangrea, L. Teppo, F. B. Askin, E. Taskinen, Y. Erozan, P. Greenwald, J. K. Huttunen, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 1996, 88, 1560–1570.
- 63 D. Albanes, N. Malila, P. R. Taylor, J. K. Huttunen, J. Virtamo, B. K. Edwards, M. Rautalahti, A. M. Hartman, M. J. Barrett, P. Pietinen, T. J. Hartman, P. Sipponen, K. Lewin, L. Teerenhovi, P. Hietanen, J. A. Tangrea, M. Virtanen, O. P. Heinonen, *Cancer Causes Control CCC*, 2000, 11, 197–205.
- 64 O. P. Heinonen, L. Koss, D. Albanes, P. R. Taylor, A. M. Hartman, B. K. Edwards, J. Virtamo, J. K. Huttunen, J. Haapakoski, N. Malila, M. Rautalahti, S. Ripatti, H. Mäenpää, L. Teerenhovi, M. Virolainen, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90, 440–446.
- 65 J. Neuzil, J. C. Dyason, R. Freeman, L. F. Dong, L. Prochazka, X. F. Wang, I. Scheffler and S. J. Ralph, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, 39, 65–72.
- 66 K. Kline, W. Yu, B. G. Sanders, *J. Nutr.*, 2004, 134, 3458S–3462S.
- 67 K. N. Prasad, B. Kumar, X. D. Yan, A. J. Hanson, W. C. Cole, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003, 22, 108–117.
- 68 A. Angulo-Molina, J. Reyes-Leyva, A. López-Malo and J. Hernández, *Nutr. Cancer*, 2014, 66, 167–176.
- 69 L. F. Dong, G. Grant, H. Massa, R. Zobalova, E. Akporiaye, J. Neuzil, *Int. J. Cancer*, 2012, 131, 1052–1058.
- 70 K. Anderson, K. A. Lawson, M. Simmons-Menchaca, L. Sun, B. G. Sanders, K. Kline, *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, 2004, 229, 1169–1176.
- 71 S. B. Riedel, S. M. Fischer, B. G. Sanders, K. Kline, *Anticancer. Drugs*, 2008, 19, 175–181.
- 72 S. Zhang, K. A. Lawson, M. Simmons-Menchaca, L. Sun, B. G. Sanders, K. Kline, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, 87, 111–121.
- 73 M. Badamchian, B. Spangelo, Y. Hagiwara, H. Hagiwara, H. Veyama, A. L. Goldstein, *Neuropsychopharmacology*, 1994, 11, 265.
- 74 L. F. Dong, P. Low, J. C. Dyason, X. F. Wang, L. Prochazka, P. K. Witting, R. Freeman, E. Swettenham, K. Valis, J. Liu, R. Zobalova, J. Turanek, D. R. Spitz, F. E. Domann, I. E. Scheffler, S. J. Ralph and J. Neuzil, *Oncogene*, 2008, 27, 4324–4335.
- 75 Y. H. Dong, Y. H. Guo, X. B. Gu, *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer*, 2009, 28, 1114–1118.
- 76 B. Yan, M. Stantic, R. Zobalova, A. Bezawork-Geleta, M. Stapelberg, J. Stursa, K. Prokopova, L. Dong, J. Neuzil, *BMC Cancer*, 2015, 15, 401.
- 77 M. Birringer, J. H. EyTina, B. A. Salvatore, J. Neuzil, *Br. J. Cancer*, 2003, 88, 1948.
- 78 V. Panda, P. Khambat, S. Patil, *Int. J. Clin. Med.*, 2011, 02, 515–529.
- 79 D. R. Green, J. C. Reed, *Science*, 1998, 281, 1309–1312.
- 80 E. D Glendening, C. R Landis, F. Weinhold, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, 2011, 2, 1–42.
- 81 E. D Glendening, J. K. Badenhop, A. E. Reed, J. E Carpenter, J. A. Bohmann, C. M Morales, F. Weinhold, NBO 5.0. Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI 2001., http://nbo6.chem.wisc.edu/biblio_css.htm, (accessed March 28, 2018).
- 82 S. Urano, Y. Hattori, S. Yamanoi, M. Matsuo, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1980, 28, 1992–1998.
- 83 W. A. Skinner, R. M. Parkhurst, *J. Org. Chem.*, 1966, 31, 1248–1251.
- 84 T. Rosenau, *Steven ER Ed Hiley-VCH Wienheim 2009 Pp-163-215*.
-

-
- 85 A. Patel, S. Bohmdorfer, A. Hofinger, T. Netscher, T. Rosenau, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 2009, 4873–4881.
- 86 S. Böhmendorfer, A. Patel, A. Hofinger, T. Netscher, L. Gille, T. Rosenau, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 2011, 3036–3049.
- 87 M. Matsuo, S. Matsumoto, T. Ozawa, *Org. Magn. Reson.*, 1983, 21, 261–264.
- 88 T. Rosenau, E. Kloser, L. Gille, F. Mazzini, T. Netscher, *J. Org. Chem.*, 2007, 72, 3268–3281.
- 89 J. M. Behan, F. M. Dean, R. A. W. Johnstone, *Tetrahedron*, 1976, 32, 167–171.
- 90 W. H. Mills, I. G. Nixon, *J. Chem. Soc. Resumed*, 1930, 0, 2510–2524.
- 91 T. Rosenau, G. Ebner, A. Stanger, S. Perl, L. Nuri, *Chem. - Eur. J.*, 2005, 11, 280–287.
- 92 K. Murase, M. Murakami, *Yamanouchi Seiyaku Kenkyu Hokoku*, 1976, 2, 66.
- 93 T. Rosenau, W. D. Habicher, *Tetrahedron*, 1995, 51, 7919–7926.
- 94 G. E. Inglett, H. A. Mattill, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6552–6554.
- 95 C. T. Goodhue, H. A. Risley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 17, 549–553.
- 96 S. Witkowski, A. Markowska, *Pol. J. Chem.*, 1996, 70, 656–657.
- 97 S. Witkowski, A. Markowska, P. Wałejko, *Pol. J. Chem.*, 1997, 71, 449–453.
- 98 S. Witkowski, P. Wałejko, *Bull. Pol. Acad. Sci. Chem.*, 1998, 46, 349–352.
- 99 S. Witkowski, I. Wawer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2002, 433–436.
- 100 I. G. Shenderovich, Z. Kecki, I. Wawer, G. S. Denisov, *Spectrosc. Lett.*, 1997, 30, 1515–1523.
- 101 W. Yang, R. G. Parr, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, 82, 6723–6726.
- 102 P. Fuentealba, P. Pérez, R. Contreras, *J. Chem. Phys.*, 2000, 113, 2544–2551.
- 103 G. I. Cárdenas-Jirón, *Int. J. Quantum Chem.*, 2002, 91, 389–397.
- 104 J. Rautio, Ed., *Prodrugs and Targeted Delivery: Towards Better ADME Properties*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2010.
- 105 S. Witkowski, P. Wałejko, *Z. Naturforschung B*, 2002, 57, 571–578.
- 106 S. Witkowski, P. Wałejko, *Z. Naturforschung B*, 2001, 56b, 411–415.
- 107 P. Wałejko, S. Witkowski, I. Wawer, *Mol Phys Rep*, 2000, 29, 192–194.
- 108 P. Wałejko, T. Żolek, S. Witkowski, I. Wawer, *Mol Phys Rep*, 2001, 33, 70–73.
- 109 M. Knaś, P. Wałejko, J. Maj, A. Hryniewicka, S. Witkowski, M. Borzym-Kluczyk, D. Dudzik, K. Zwierz, *Toxicol. Mech. Methods*, 2008, 18, 491–496.
- 110 M. Knaś, P. Wałejko, J. Maj, A. Hryniewicka, S. Witkowski, S. Szajda, D. Dudzik, K. Zwierz, *Exp. Clin. Hepatol.*, 2006, 2, 51–53.
- 111 M. Knaś, S. Szajda, J. Snarska, G. Zalewska-Szajda, P. Wałejko, *Hepatogastroenterology*, 2009, 56, 339–342.
- 112 W. Niczyporuk, P. Aleksiejczuk, S. Witkowski, E. Krajewska-Kułak, M. Niczyporuk, P. Wałejko, *Farm. Pol.*, 2003, 59, 35–37.
- 113 G. Neunert, P. Polewski, P. Wałejko, M. Markiewicz, S. Witkowski, K. Polewski, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2009, 73, 301–308.
- 114 G. Neunert, P. Polewski, M. Markiewicz, P. Wałejko, S. Witkowski, K. Polewski, *Biophys. Chem.*, 2010, 146, 92–97.
- 115 G. Neunert, A. Szewngiel, P. Wałejko, S. Witkowski, K. Polewski, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2016, 160, 121–127.
- 116 S. Witkowski, P. Wałejko, M. Knaś, J. Maj, D. Dudzik, J. Marciniak, A. Z. Wilczewska, K. Zwierz, *II Farm.*, 2004, 59, 669–671.
- 117 H. K. Chenault, R. F. Mandes, *Tetrahedron*, 1997, 53, 11033–11038.
- 118 R. U. Lemieux, J. D. T. Ciperia, *Can. J. Chem.*, 1956, 34, 906–910.
- 119 G. J. Boons, Ed., *Carbohydrate Chemistry*, Springer Netherlands, 1998.
- 120 S. Shoda, M. Moteki, R. Izumi, M. Noguchi, *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 8847–8848.
- 121 K. Brzezinski, P. Wałejko, A. Baj, S. Witkowski, Z. Dauter, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online*, 2011, 67, o718–o718.

Piotr Wałejko