



dr hab. inż. Witold Gładkowski

Wrocław, 27.02.2018

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Koziół pt. "Synteza nowych tlenowych i azotowych pochodnych terpenoidowych"

Tematyka badawcza podjęta przez panią mgr inż. Agatę Koziół umiejscawia przedstawioną do recenzji pracę doktorską w obszarze dwóch dziedzin naukowych: dziedzinie nauk chemicznych oraz dziedzinie nauk biologicznych. Wynika to bezpośrednio z celu pracy, którym była synteza chemiczna tlenowych i azotowych pochodnych z naturalnych związków monoterpenoidowych, jak również ocena ich właściwości zapachowych oraz różnorodnych właściwości biologicznych (aktywności antyfidantnej, przeciwdrobnoustrojowej oraz zdolności do hamowania aktywności enzymatycznej). Choć drugi z wymienionych celów nie znalazł odzwierciedlenia w tytule pracy, oba cele uznaję za równorzędne i w pełni uzasadnione. Wpisują się one w jeden z obowiązujących obecnie nurtów badań z zakresu chemii produktów naturalnych, w którym proste związki o budowie izoprenoidowej, same charakteryzujące się wielokierunkową aktywnością biologiczną, stanowią cenny surowiec do otrzymywania nowych, aktywnych biologicznie pochodnych. Badania takie od wielu lat prowadzone są również w Zakładzie Chemii Bioorganicznej w zespole prof. Stanisława Lochyńskiego.

Praca doktorska mgr inż. Agaty Koziół to 113-stronicowe opracowanie, podzielone na pięć głównych, ponumerowanych rozdziałów zatytułowanych: Przegląd literatury, Cel pracy, Badania własne, Badania biologiczne i Część eksperymentalna. Całość poprzedzona jest spisem treści, objaśnieniem zawartych w pracy skrótów oraz wykazem nazw systematycznych mikroorganizmów, roślin i owadów w języku polskim i łacińskim. Całość kończą nienumerowane rozdziały: Podsumowanie, Bibliografia oraz Aktywność naukowa.

Część literaturowa, poprzedzona krótkim wstępem, to przede wszystkim krótki przegląd związków terpenowych i ich właściwości biologicznych: aktywności przeciwnowotworowej, przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej, antyfidantnej oraz właściwości zapachowych. Objętościowo jest to bogaty materiał źródłowy (32 str.), jednak zdaniem Recenzenta Autorka powinna nieco inaczej rozłożyć akcenty. Przykładowo, zamiast bardzo dokładnego opisu



aktywności antyproliferacyjnej limonenu czy alkoholu perylowego, należało więcej miejsca poświęcić aktywności przeciwdrobnoustrojowej ketonów monoterpenowych będących substratami w planowanych przez doktorantkę syntezach tj. pulegonu, mentonu czy dihydrokarwonu, a także opisać znane w literaturze przykłady aktywności antyfidantnej tej grupy związków. Byłby to doskonały materiał porównawczy w stosunku do uzyskanych przez Doktorantkę wyników aktywności biologicznej otrzymanych przez Nią pochodnych. Podobna uwaga dotyczy rozdziału dotyczącego oksymów, w którym zaprezentowano bardzo ogólne informacje na temat właściwości biologicznych tych związków. Z uwagi na bardzo dużą różnorodność strukturalną tych połączeń rozdział ten powinien dotyczyć przede wszystkim oksymowych pochodnych terpenowych, podobnie jak to zostało przedstawione w przypadku laktonów terpenoidowych. Duży niedosyt pozostawia lektura podrozdziału pt. "Związki pochodzenia naturalnego - hamowanie ureazy" w którym Autorka podaje jedynie 4 przykłady inhibitorów tego enzymu należących do grupy flawonoidów, przytaczając też lakoniczną wzmiankę o aktywności inhibitującej karwonu względem ureazy nazwanej przez Autorkę ureazą glebową. Jakie jest faktyczne pochodzenie tego enzymu i czy Autorka zna z literatury inne związki, w tym związki terpenowe, wykazujące wspomnianą aktywność?

W części literaturowej Autorka nie ustrzegła się błędów merytorycznych, niekonsekwencji i nieprecyzyjnych sformułowań m.in. "czynniki fosforoorganiczne" (str. 13), "przenikalność naczyń krwionośnych", "biologicznie reaktywne oksymy", "stężenia kombinacji monoterpenów" czy "most peroksydowy" w cząsteczce artemizyny. Przy opisie laktonów drimanowych nie podano wobec jakich owadów wykazują one właściwości antyfidantne, z kolei w rozdziale dotyczącym aktywności przeciwdrobnoustrojowych monoterpenów opisane są właściwości przeciwzapalne 1,8-cineolu. Ugrupowanie oksymowe jest przedstawione na str. 13 trzema różnymi wzorami, przy czym tylko pierwszy z nich jest prawidłowy. Cząsteczka tlenu azotu ma rzeczywiście postać rodnika, ale niesparowany elektron znajduje się na atomie azotu, a nie tlenu (str. 13).

Kolejny rozdział dysertacji to opisany już na wstępie recenzji "Cel pracy", następnie Autorka przechodzi do opisu wyników badań własnych. W ich toku Autorka, posługując się znanymi w preparatyce organicznej procedurami syntetycznymi otrzymała serię tlenowych oraz azotowych pochodnych związków monoterpenowych. W ramach syntezy pierwszej z wymienionych grup w wyniku reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa odpowiedniego



KATEDRA CHEMII

fosfonianu ze związkami kabonylowymi ((+)-dihydrokarwonem, (-)-mentonem, (-)-werbenonem, (+)-pulegonem, β -cyklocytralem oraz t-butylocykloheksanonem) otrzymanych zostało osiem α,β -nienasyconych estrów, głównie z układem alkilidenocykloheksanu. Dwa spośród otrzymanych estrów (**75** i **80**) zredukowano przy użyciu glinowodoru litu do odpowiednich alkoholi allilowych (**87** i **88**), które następnie poddano przegrupowaniu Claisena w ortoocotanowej modyfikacji Johnsona uzyskując γ,δ -nienasycone estry (**90**, **93**). Posłużyły one jako substraty w reakcji bromolaktonizacji, w wyniku której otrzymane zostały dwa δ -bromo- γ -laktony z układem spiranu (**96** i **97**). Ester **90** dodatkowo zhydrolizowano w środowisku zasadowym do kwasu **94**, który poddano reakcji jodolaktonizacji. Niestety nie udało się w tym przypadku uzyskać czystego produktu. Równolegle analogicznej sekwencji reakcji poddano otrzymany w wyniku redukcji β -cyklocytralu borowodorkiem sodu alkohol allilowy **91**, co pozwoliło na otrzymanie dwóch laktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu: δ -bromo- γ -laktonu **98** i jego analogu **99** zawierającego atom jodu.

Synteza pochodnych azotowych obejmowała otrzymanie dziesięciu oksymów w reakcji ketonów monoterpenoidowych z chlorowodorkiem hydroksyloaminy. Trzy z uzyskanych pochodnych przekształcono następnie do odpowiednich laktamów w wyniku przegrupowania Beckmanna. Dla wszystkich uzyskanych związków przeprowadzono analizy spektroskopowe (HRMS, ^1H NMR, ^{13}C NMR) i oznaczono podstawowe stałe fizyczne: temperaturę topnienia lub współczynnik załamania światła, a w przypadku związków optycznie czynnych skręcalność właściwą.

Przy omówieniu uzyskanych wyników Autorka opisuje mechanizmy reakcji, jednak czyni to językiem mało precyzyjnym, pełnym skrótów myślowych i uproszczeń. Znane powszechnie mechanizmy reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa czy przegrupowania Beckmanna pokazane są jedynie na ogólnych przykładach. Nie rozumiem intencji przedstawienia mechanizmu przegrupowania Beckmanna w środowisku kwaśnym (Schemat 10), skoro Autorka przeprowadzała je w obecności NaOH z udziałem chlorku tosyłu, co obrazuje Schemat 11. Wiele wątpliwości budzi sposób opisu reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa. Nie wiem, co Autorka ma na myśli pisząc o " α -metalicznym fosfonianie". Na schemacie ze strony 44 i w opisie na stronie 45 jako reagenty wymienione są DBU oraz LiCl, tymczasem w części doświadczalnej (str. 79) mowa jest o wodorku sodu, brak informacji o dodatku chlorku litu, a na str. 80 autorka podaje, że stosowała DBU. Czy tylko w przypadku związku **74**? Proszę



o wyjaśnienie tych niezgodności. Niezależnie od tego, rolą DBU na pewno nie jest "przeprowadzenie nukleofilowej addycji". Na Schemacie 5 str. 44 brak najważniejszego reagenta - fosfonianu dietylowego.

W tej części dysertacji uporządkowania lub wyjaśnienia wymagają następujące kwestie:

1. Tytuł pracy wyraźnie mówi o pochodnych terpenoidowych, natomiast *t*-butylocykloheksanonu nie można zaliczyć do tej grupy związków.
2. Związki z układem alkilidenocykloheksanu otrzymane z *t*-butylocykloheksanonu nie posiadają asymetrycznych atomów węgla, mimo to są czynne optycznie. Skąd wynika ich chiralność i jak Doktorantka wyjaśni otrzymywanie w przewodzie prawoskrętnego enancjomeru estru **74** w wyniku reakcji Hornera-Wadswortha-Emmons'a?
3. Zgodnie z danymi w części doświadczalnej, (-)-*cis*-karan-3-on (**50**) uzyskano w reakcji z odczynnikiem Browna-Garga, o czym Autorka nie wspomina przy opisie wyników. Jaki związek był substratem w tej reakcji i na czym ona polegała?
4. Nieporządek widoczny jest przy opisie statusu uzyskanych związków. Przy opisie badań własnych nie odniesiono się do danych spektroskopowych alkoholu **88**, który nie został dotychczas opisany w literaturze. Wyjaśnienia wymaga status związku **84**. Z jakiego substratu został otrzymany i czy jest on związkiem nowym? Jeśli tak, należało podać jego dane spektroskopowe, a z uwagi na jego właściwości jako inhibitora ureazy - zgłosić do ochrony patentowej. Nieprawidłowe cytowanie lub jego brak dotyczy związków (-)-**50**, (-)-**80**, **74**, (-)-**78**, (+)-**77**, (+)-**82**, **87**. Należy unikać cytowania jednocześnie kilku prac przy przytaczaniu danych kilku związków, tak jak to ma miejsce w przypadku oksymów. Nie wiadomo bowiem, w której dokładnie publikacji opisany został konkretny związek.
5. Opis danych spektroskopowych otrzymanych związków wymaga dogłębnej korekty. Przytoczę tu jedynie reprezentatywny również dla innych połączeń fragment opisu widma ¹H NMR związku **86**, w którym sygnał od protonów przy atomie C-16 został opisany jako kwartet z dwoma stałymi sprzężeniami. W rzeczywistości powinien on być trypletem o stałej sprzężenia ok. 7 Hz.
6. W opisie części doświadczalnej obok pomiarów skręcalności optycznej związków brakuje określenia ich nadmiarów enancjomerycznych. W przypadku reakcji



zachodzących poza centrami chiralności czystość optyczna nie powinna się zmieniać; niestety brak jest też danych dla wyjściowych chiralnych ketonów.

Otrzymane w wyniku reakcji Hornera-Wadswortha-Emmons α,β -nienasycone estry z układem alkilidenocykloheksanu poddane zostały ocenie sensorycznej w zespole prof. Józefa Kuli z Politechniki Łódzkiej. Charakteryzowały się one interesującymi z punktu widzenia przemysłu spożywczego zapachami takimi jak zapach miętowy, owocowo-ziołowy czy też przypominający przyprawy takie jak kardamon i pieprz. Pozostałe otrzymane związki testowano pod kątem różnych właściwości biologicznych. W przypadku bromolaktonów z układem spiranu (**96** i **97**) określono ich aktywność antyfidantną względem pleśniakowca lśniącego i mszycy brzoskwiniowej. Badania te zostały wykonane odpowiednio w zespole dr hab. Maryli Szczepanik z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz w zespole prof. dr hab. Beaty Gabryś z Uniwersytetu Zielonogórskiego. Lakton **96** wykazał średnią lub dobrą aktywność deterentną wobec larw i osobników dorosłych pleśniakowca lśniącego, znacznie słabszą aktywność wykazano dla laktonu **97**, który w przypadku larw testowanego owada wykazywał wręcz cechy atraktanta pokarmowego. W przypadku mszycy brzoskwiniowej sytuacja była odwrotna - większą aktywność stwierdzono dla laktonu **96**.

Kolejne badania przeprowadzone zostały we współpracy z pracownikami macierzystej jednostki Doktorantki - dr inż. Katarzyną Macegoniuk i mgr inż. Ewą Grelą. Dotyczyły one hamowania aktywności enzymu ureazy przez otrzymane w wyniku syntezy związki i niektóre substraty reakcji, a także aktywności przeciwbakteryjnej. Poszukiwanie nowych inhibitorów ureazy jest uzasadnione ze względu na fakt, iż enzym ten jest kluczowy w metabolizmie Gram(-) szczepów bakterii, powodujących infekcje układu moczowego i błony śluzowej żołądka. Z lektury rozdziału "Badania własne" wynika, że początkowo testy prowadzono względem oczyszczonej ureazy pochodzącej ze szczepu *Sporosarcina pasteurii* CCM2056TM, z kolei w części doświadczalnej podany jest opis wydzielenia tego enzymu z *Proteus mirabilis*. Proszę o wyjaśnienie tej rozbieżności. Najbardziej aktywne związki testowano na aktywność względem szczepów *Proteus mirabilis* PCM 1360 i *Helicobacter pylori* J99. Aktywność ta jest określana przez Doktorantkę raz jako "hamowanie całych komórek" a raz jako "hamowanie aktywności ureolitycznej". Czy Doktorantka ma na myśli hamowanie wzrostu badanych



szczepów, na co wskazywałoby stosowanie parametru IC_{50} , czy jednak aktywność względem wydzielanych ureaz?

Wyniki dla oczyszczonego enzymu podano jako stałe inhibicji K_i , które wyznaczono dla inhibitorów niekompetycyjnych. Proszę wyjaśnić na czym polega inhibicja niekompetycyjna i skąd wiadomo, że testowane związki wykazują taki właśnie mechanizm inhibicji w stosunku do ureazy. Opis wyników zestawionych w Tabeli 17 na str. 68 zawiera nieścisłości: Autorka w tekście nie wymienia wszystkich związków aktywnych, na str. 64 ester **84** kwalifikuje jako keton a dane zamieszczone dla niego w Tabeli 17 dla całych komórek badanych szczepów w istotny sposób różnią się od tych omawianych w tekście. Jest to o tyle istotne, że obok bromolaktonu **98** to właśnie ester **84** wykazał najniższą wartość stałej inhibicji względem oczyszczonego enzymu czyli największą aktywność. Jako związek referencyjny w tych badaniach stosowano kwas aceto hydroksamowy, znany inhibitor ureazy stosowany w leczeniu zakażeń układu moczowego. Testowane związki wykazały niższą aktywność od związku referencyjnego, co jednak nie dziwi ze względu na kompetycyjny mechanizm hamowania ureazy przez ten inhibitor. Uwagę zwraca natomiast porównywalna z kontrolą wartość IC_{50} oznaczona dla bromolaktonu **98** w teście względem szczepu *P.mirabilis* PCM 1360, o czym jednak Autorka nie wspomina w tekście. Związek ten okazał się również najbardziej aktywny względem *H.pylori* J99. Dość duża rozbieżność strukturalna testowanych połączeń uniemożliwia wyciągnięcie konkretnych wniosków dotyczących korelacji struktura-aktywność inhibitująca względem ureazy. W przypadku karwonu Autorka zauważyła jedynie wpływ konfiguracji centrów stereogenicznych skutkujący aktywnością jedynie jego (+)-enancjomeru. Istotna był również obecność wiązania podwójnego w cząsteczkach ketonów monoterpenuidowych: (+)-karwon i (+)-pulegon były aktywne w przeciwieństwie do ich całkowicie lub częściowo uwodornionych analogów: (+)-dihydrokarwonu i (-)-mentonu.

Otrzymane związki testowano również na aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*, choć nie znalazłem uzasadnienia wyboru akurat tych mikroorganizmów. W tych badaniach spośród pochodnych tlenowych aktywność wykazały jedynie bromolakton **98** i ester **84**, a więc związki które wykazywały również największą aktywność wobec szczepów o uzdolnieniach ureolitycznych, jednak zdecydowanie aktywniejsze były pochodne azotowe, a zwłaszcza oksymy karwonu (+)-**106**, (-)-**106** hamujące wzrost wszystkich trzech badanych szczepów. Oksym (-)-fenchonu oraz (-)-



mentonu działały selektywnie względem bakterii Gram-(+). Nie stwierdzono aktywności oksymów otrzymanych z *t*-butylocykloheksanonu, (+)-dihydrokarwonu i (+)-fenchonu. W Tabeli 18 na str. 70 nie znalazłem wyników dla oksymu o numerze **103**. Spośród trzech uzyskanych laktamów jedynie laktam **108** wykazywał aktywność względem szczepu *S.aureus*. W sumie określono aktywność 9 oksymów i 3 laktamów. Do pełnej oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej zabrakło porównania aktywności testowanych związków z aktywnością któregoś z powszechnie stosowanych antybiotyków.

Generalnie w części dotyczącej badań biologicznych omówienie wyników jest chaotyczne i mało dokładne, brak także ich porównania z wynikami aktywności antyfidantnej lub przeciwdrobnoustrojowej związków o podobnej budowie. Przykładowo badaniom na aktywność deterentną można było również poddać laktony **98** i **99**. W literaturze opisano już co prawda taką aktywność wymienionych związków, jednak tylko wobec szkodników magazynów zbożowych. Testy względem mszycy brzoskwińskiej i pleśniakowca lśniącego pozwoliłoby uzupełnić dotychczasową wiedzę w tym zakresie. Badania aktywności inhibitującej względem ureazy należało zaplanować tak, by można było stwierdzić wpływ lub brak wpływu dokonanych modyfikacji na aktywność uzyskanych połączeń. Przetestowano ich w sumie 18, ale nie układają się one w logiczny ciąg, co czyni dyskusję uzyskanych wyników uboższą i znacznie trudniejszą. Przykładowo, wśród badanych ketonów monoterpenuidowych znalazły się nie tylko substraty syntez, ale także enancjomery fenchonu. Spośród estrów uzyskanych w reakcji Hornera-Wadswortha-Emmonsa testowano tylko 4 połączenia, oprócz bromolaktonów z układem cykloheksanu należało określić aktywność również tych z układem spiranu itd. Szkoda, że Autorka z uzyskanych 10 oksymów zsyntetyzowała jedynie trzy laktamy; interesujące, czy słaba aktywność tych ostatnich potwierdziłaby się dla wszystkich związków tej grupy.

Do największych osiągnięć Doktorantki w trakcie realizacji badań opisanych w dysertacji zaliczam:

1. Otrzymanie 21 tlenowych pochodnych terpenów, w tym ośmiu nowych, nieopisanych dotychczas w literaturze (4 estrów, 1 alkoholu allilowego, 1 kwasu i 2 bromolaktonów). Wszystkie nowe związki zostały zgłoszone do ochrony patentowej.
2. Określenie charakterystyki zapachowej ośmiu zsyntetyzowanych estrów. Związki te mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako składniki mieszanin zapachowych.



KATEDRA CHEMII

3. Określenie zdolności uzyskanych połączeń do inhibicji ureazy oraz zdolności do hamowania wzrostu szczepów bakterii o aktywności ureolitycznej. Badania te pozwoliły na wyselekcjonowanie dwóch związków o stosunkowo wysokiej aktywności: nowego estru **84** oraz znanego w literaturze bromolaktanu **98**. Związki te w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii chorób układu moczowego czy wrzodów żołądka.
4. Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej znanych w literaturze 13 terpenowych pochodnych azotowych: oksymów i laktamów, spośród których obiecujące w kontekście zastosowania praktycznego są oksymy uzyskane z obu enancjomerów karwonu ((+)-**106** i (-)-**106**).

Podkreślić należy, iż badania aktywności biologicznej wykonane zostały we współpracy z innymi zespołami i ośrodkami naukowymi, co świadczy o cennej umiejętności pracy Doktorantki w interdyscyplinarnych zespołach badawczych. Oprócz wspomnianych 7 zgłoszeń patentowych Doktorantka jest współautorką w sumie 10 publikacji, w tym m.in. dwóch artykułów przeglądowych w czasopiśmie *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* oraz dwóch rozdziałów w monografii "*Na pograniczu chemii i biologii*".

Pomimo zauważonych podczas lektury pracy błędów i niedociągnięć oraz wszelkich uwag krytycznych, z których część ma charakter polemiczny, recenzowana praca doktorska spełnia podstawowe wymogi określone w artykule 13 "Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" z dnia 14 marca 2003 roku. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie pani mgr inż. Agaty Kozioł do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W. Gładkowski