



UNIWERSYTET
O P O L S K I

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole
tel. 077 452 71 00
fax 077 452 71 01
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. zw. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

Opole, 2017-08-28

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Arlety Sierakowskiej

z tytułu

„Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena aktywności biologicznej nowych pochodnych kofeiny”

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Arlety Sierakowskiej, wykonanej pod kierunkiem prof. UAM, dr hab. Beaty Jasiewicz, są zagadnienia związane z syntezą nowych pochodnych kofeiny, analizą spektroskopową otrzymanych związków oraz określeniem ich stabilności termodynamicznej i aktywności biologicznej.

Kofeina i jej pochodne jako heterocykliczne związki organiczne zawierające w cząsteczce zasadowy atom azotu zaliczane są do alkaloidów. Alkaloidy klasyfikuje się na podstawie pochodzenia, np. alkaloidy opium, alkaloidy sporyszu lub na podstawie budowy chemicznej pierścienia heterocyklicznego gdzie wyróżniamy alkaloidy purynowe, sterolowe, chinolinowe, pirolizydynowe, czy alkaloidy pirydynowe i piperidynowe. Alkaloidy i ich pochodne wykazują różnorodne działanie biologiczne na organizmy ludzi i zwierząt, dlatego też wzbudzają duże zainteresowanie, również chemików organicznych. Kofeina jest głównym przedstawicielem alkaloidów purynowych i podobnie jak inne związki oparte na szkieletie ksantyny wykazuje interesujące właściwości biologiczne. Do najważniejszych należą właściwości antyoksydacyjne, antagonistyczne w stosunku do receptorów adenozynowych oraz właściwości przeciwnowotworowe. Z tego też powodu kofeina i jej pochodne znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym oraz w przemyśle spożywczym, jako dodatki do napojów energetycznych.

Do tej pory zsyntezowano wiele różnorodnych analogów alkaloidów o interesujących właściwościach biologicznych. Również w Pracowni Chemii Związków Heterocyklicznych Wydziału Chemii UAM od lat prowadzone są prace nad syntezą i badaniem właściwości nowych pochodnych alkaloidów z różnych grup, w tym alkaloidów pirymidynowych i purynowych.

Wobec powyższego, podjęcie przez Panią mgr Arletę Sierakowską badań dotyczących metod syntezy, ustalenia struktury i badania właściwości biologicznych nowych pochodnych kofeiny mieści się w szerokim programie badań prowadzonych w tej Pracowni i było, zdaniem recenzenta, jak najbardziej uzasadnione.

Oceniana rozprawa napisana została w klasycznym układzie rozdziałów i zawiera wszystkie elementy cechujące dobrze przygotowaną i napisaną rozprawę doktorską. Przedstawiona do oceny praca składa się z czterech zasadniczych części, wstępu i celu pracy, części literaturowej, dyskusji wyników, części eksperymentalnej i podsumowania. Ponadto zawiera streszczenia, spis literatury (272 pozycje literaturowe), spis tabel i osiągnięć naukowych Doktorantki oraz trzy załączniki. Załącznik 1 to obliczone wartości współrzędnych atomów i obliczone konformacje związków, załącznik 2 to schematy prowadzonych reakcji i kopia publikacji z zakresu pracy jako załącznik 3.

Część literaturową pracy otwiera krótkie wprowadzenie w tematykę alkaloidów oraz charakterystyka alkaloidów purynowych. Następnie Autorka szczegółowo omawia dane literaturowe dotyczące kofeiny, w tym jej właściwości fizykochemiczne, biosyntezę i syntezę chemiczną, metabolizm i oddziaływanie na organizm ludzki. Omówienie literatury kończą informacje dotyczące pochodnych kofeiny jako antagonistów receptorów adenylinowych i inhibitorów oksydazy aminowej oraz właściwości przeciwnowotworowych, antybakteryjnych i przeciwgrzybiczych kofeiny i jej pochodnych. Treści zawarte w tej części rozprawy podane są we właściwych proporcjach i są zgodne z zakresem podjętych badań. Zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim ta część pracy świadczy o trafnym doborze treści i nie budzi zastrzeżeń. Część literaturowa poparta jest wieloma aktualnymi i dobrze dobranymi cytacjami z literatury.

Trzecią część rozprawy zatytułowaną „Dyskusja wyników” Autorka rozpoczyna od omówienia syntezy i analizy spektroskopowej siarkowych pochodnych kofeiny,

wykorzystując do tego celu ^1H i ^{13}C NMR, EI-MS i FT-IR, a do określenia czystości chromatografię cienkowarstwową i oznaczenie temperatury topnienia. Dla czterech z dziesięciu otrzymanych pochodnych określono również strukturę krystalograficzną, wykazując że wszystkie badane związki krystalizują w układzie jednoskośnym w grupie przestrzennej $P2_1/m$ lub $P2_1/c$, a układ ksantyny i wiązanie C-S są koplanarne. Następnie omawia właściwości biologiczne zsyntezowanych związków. W pierwszym rzędzie przedstawia aktywność hemolityczną oraz cytotoksyczność wobec erytrocytów ludzkich *in vitro* wykorzystując badanie wpływu związków na strukturę błony białkowo-lipidowej. Następnie przedstawia analizę właściwości antyoksydacyjnych opartą o ocenę aktywności przeciwrodnikowej jako zdolności zmiatania wolnych rodników DPPH oraz zdolności redukcji jonów Fe^{+3} do Fe^{+2} wobec Troloxu i BHT jako standardowo stosowanych związków odniesienia. Wykazała, że dwie z otrzymanych pochodnych wykazują aktywność wynoszącą ponad 60 % aktywności przeciwrodnikowej substancji odniesienia. Następnie omawia otrzymane wyniki badania aktywności przeciwgrzybiczych i antibakteryjnych. Z przedstawionych danych wynika, że z przebadanych sześciu związków (związki 5-9) i 8-bromokofeina, jedynie związek 9 wykazał w miarę dobrą aktywność przeciwgrzybiczną wobec badanych gatunków grzybów. Natomiast aktywność antibakteryjną, względem bakterii tlenowych Gram dodatnich i Gram ujemnych, określono dla kofeiny, 8-bromokofeiny i pochodnej 10. Największe zahamowanie wzrostu osiągnięto dla związku 10, które wynosiło 34 i 32 mm w stosunku do Gram dodatnich szczepów *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz 22 mm dla Gram ujemnego szczepu *E. coli*. Ponadto dla związków 2-10 zastosowano analizę farmakokinetyczną z wykorzystaniem metody *in silico*, w celu określenia biodostępności tych związków. Analiza ta pozwoliła na stwierdzenie, że najlepszą biodostępnością charakteryzują się związki 8 i 9.

Następnie omawia syntezę i analizę spektroskopową di- i poliaminowych pochodnych kofeiny. Dla tej grupy związków, na podstawie analizy niskorozdzielczych widm masowych (EI-MS), opracowała również schematy fragmentacji i wyznaczyła trzy możliwe ścieżki rozpadu poszczególnych związków. Zbadala również stabilność termodynamiczną otrzymanych związków wykorzystując do tego celu, oprócz symulowanego wyżarzania, obliczone za pomocą dynamiki molekularnej współczynniki RMSD (Root mean square deviation of atomic positions). Na tej podstawie określiła liczbę możliwych konformacji związków oraz stwierdziła, że najmniej stabilnym termodynamicznie jest związek 17

(obliczone konformacje i wartości współrzędnych atomów zawiera Załącznik 1). Spośród właściwości biologicznych określiła aktywność hemolityczną i zdolność oporności osmotycznej oraz właściwości antyoksydacyjne i stwierdziła, że jedynie związek 14 wykazuje niewielką zdolność zmiatania wolnych rodników w teście z DPPH (23% aktywności Troloxu). Natomiast kilka związków (związki 15, 20-22) wykazywało potencjał redukcyjny jonów żelaza na poziomie ok. 50% Troloxu i ok. 70% BHT. Określiła również cytotoksyczność oraz zdolność antyproliferacyjną tych pochodnych względem komórek nowotworowych piersi MCF-7. Wykazała, że związki te wykazują zróżnicowaną, zależną od budowy, cytotoksyczność oraz że najbardziej aktywnymi pochodnymi były związki 24 i 25, dla których wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio 100 μ M i 75 μ M. Natomiast na podstawie analizy farmakokinetycznej stwierdziła, że najkorzystniejszym poziomem biodostępności charakteryzują się związki 26 i 27.

Ostatnią grupą otrzymanych i omawianych związków są modyfikowane bezwodnikami kwasowymi diaminowe pochodne kofeiny (związki 28-39), otrzymane w reakcji ogrzewania z bezwodnikami maleinowym, bursztynowym i octowym oraz pięć nowych pochodnych otrzymanych w wyniku reakcji otwierania pierścienia tiofenu (związki 40-44). Związki te scharakteryzowała spektroskopowo (1H i ^{13}C NMR, EI-MS i FT-IR), a przebieg reakcji kontrolowała za pomocą TLC. Wykorzystując dynamikę molekularną określono również stabilność termodynamiczną tych pochodnych i stwierdzono, że najbardziej stabilną strukturę posiada związek 42, a nieco mniejszą związek 41. Dla tych związków wyznaczono dwie konformacje, a dla związków 40, 43 i 44 zaobserwowano trzy konformacje. Tę grupę związków zbadano pod kątem właściwości protekcyjnych, aktywności hemolitycznej oraz wpływu na morfologię erytrocytów. W trakcie są natomiast badania cytotoksyczności. Z badań tych wynika, że wszystkie analizowane związki wykazują zdolność do chelatowania jonów Fe^{+2} wynoszącą powyżej 50% aktywności EDTA. Większość tych związków wykazała również znaczącą aktywność protekcyjną, osiągając 80% aktywności Troloxu. Natomiast z analizy farmakokinetycznej wynika, że dla związków 40-44 biodostępność, stopień biodegradacji oraz toksyczność maleją wraz z wydłużaniem się łańcucha diaminowego jako podstawnika w pozycji C-8.

Czwarta część rozprawy („Cześć eksperymentalna”) to wykaz stosowanych odczynników, krótki opis stosowanych metod syntezy i wykonanych badań właściwości

fizykochemicznych, określania struktury, analizy rentgenograficznej, opis metod symulacji dynamiki molekularnej oraz stosowane metody oceny aktywności biologicznej.

Dodatkowo po podsumowaniu, streszczeniach i spisie literatury przedstawiony jest wykaz publikacji i innych osiągnięć naukowych Autorki. Na dorobek ten składają się 1 publikacja z tzw. Listy Filadelfijskiej i 2 prace opublikowane w materiałach konferencyjnych, współautorstwo jednego skryptu, oraz 3 wystąpienia i 8 plakatów na konferencjach.

Na podstawie analizy wyników i zaprezentowanych wniosków za najważniejsze dokonania Doktorantki uznają:

- opracowanie wydajnych metod syntezy kilkudziesięciu nowych siarkowych i diaminowych pochodnych kofeiny oraz modyfikowanych bezwodnikami kwasowymi pochodnych diaminowych, których strukturę potwierdzono metodami spektroskopowymi;
- wykorzystanie symulacji za pomocą dynamiki molekularnej do określenia stabilności termodynamicznej zsyntezowanych związków;
- określenie szerokiego spektrum aktywności biologicznej;
- wykazanie, że otrzymane związki wykazują interesujące właściwości biologiczne, zarówno aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wybranych gatunków bakterii i grzybów, a także właściwości protekcyjnych wobec erytrocytów ludzkich, aktywność hemolityczną oraz cytotoksyczność.

Na uwagę zasługuje również fakt szerokiego zakresu badań, których część została wykonywana w kilku innych jednostkach, co świadczy o umiejętności współpracy ze specjalistami z różnych dziedzin.

Podsumowując opisane powyżej elementy stwierdzam, że Pani mgr Arleta Sierakowska osiągnęła postawione sobie cele badań, a poniżej przedstawiam kilka pytań i uwag, które nasunęły mi się w trakcie lektury dysertacji:

1. Dlaczego wstępnym testom aktywności przeciwgrzybiczej siarkowych pochodnych kofeiny za pomocą bioautografii-TLC poddano tylko związki 5-9?

2. Na jakiej podstawie do testów aktywności antybakteryjnej wybrano kofeinę 8-bromokofeinę i tylko jeden związek z siarkowych pochodnych kofeiny (związek 10)?
3. Dlaczego nie porównano aktywności biologicznej siarkowych pochodnych kofeiny wobec znanych, typowych substancji o działaniu przeciwgrzybicznym i antybakteryjnym, co ułatwiłoby interpretację wyników. Również dyskusja wyników cytotoksyczności powinna zawierać porównanie z danymi dotyczącymi innych związków, co pozwoliłoby na określenia, czy uzyskane IC₅₀ wynoszące 100 μM i 75 μM, to wartości interesujące pod kątem możliwego zastosowania tych związków.
4. Wyjaśnienia wymagają fakt, iż dla niektórych pochodnych temperatury topnienia wyznaczone zostały z dokładnością 5 °C (np. związki 3, 5, 11-14). Czy wynika to z obecności zanieczyszczeń?
5. W opisie badania właściwości biologicznych nie podano w jakich rozpuszczalnikach nanoszono roztwory badanych związków, np. właściwości grzybobójczych (...nanesiono 8 μL roztworu o stężeniu 1%) czy w opisach oceny potencjału redukcyjnego, aktywności przeciwrodnikowej czy oceny właściwości protekcyjnych.

Pomimo tego, że rozprawa jest dobrze napisana to Autorka nie ustrzegła się wielu błędów redakcyjnych i literowych, a te dostrzeżone przez recenzenta przedstawione są poniżej:

str. 4 w. 12: powinno być „ze względu” ,

str. 8 w. 9: powinno być „w komórkach”

str. 12 w. 3 od dołu: powinno być „kokryształy” , w. 9 od dołu: powinno być „aromatyczny”

str. 20 w. 7 od dołu: powinno być „podatności”

str. 21 w. 7: powinno być „wzrost czułości”

str. 23 w. 1: powinno być „transbłonową” , i w. 2 od dołu: „płytkach krwi”

str. 25 w. 2: powinno być „deaminowania” i w. 6 „enzymem mitochondrialnym”

str. 26 w. 7: powinno być „W reakcjach”

str. 28 w. 2 od dołu: „ ...rodnik nadtlenkowy może reagować z wielonasyconymi kwasami... ”?

str. 32 w. 6: powinno być „uszkodzeń”

str. 33 w. 8; ołów jako związek? i w. 11 powinno być „stres oksydacyjny”

str. 34 w. 13: powinno być „większy” i w w. 16 „naturalnym lekiem”

str. 57 w. 11: powinno być „przedstawiłam”

str. 66 w. 4 od dołu: powinno być „uzależniony od długości”

str. 79 w. 7: powinno być „za pomocą”

str. 92 w. 9 od dołu: powinno być „bezwodnikami cyklicznymi”

str. 104 w. 6 od dołu: powinno być „przesunąć chemicznych” i w. 11 od dołu: „tiofenu”

str. 140 w. 9: powinno być „dynamiki molekularnej”

str. 145 w. 3 od dołu: powinno być „ Świeży koncentrat...”

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Arleta Sierakowska wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań nad syntezą pochodnych kofeiny oraz badaniem ich struktury i właściwości biologicznych. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Arlety Sierakowskiej **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

