

Prof. dr hab. Eugeniusz Grech

Szczecin, 20-05-2013

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jacka Rutkowskiego**

***”Badania spektroskopowe, strukturalne i aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowych soli kwasu lasalowego z aminami”***

Mgr Jacek Rutkowski przedłożył do oceny pracę napisaną pod opieką promotora Prof. dr hab. Bogumiła Brzezinskiego oraz promotora pomocniczego dr Adama Huczyńskiego, którą realizował w Zakładzie Biochemii Wydziału Chemii UAM w Poznaniu.

Tematyka pracy dotyczy nowej interesującej grupy pochodnych kwasu lasalowego, a mianowicie jego soli z aminami. Kwas lasalowy należy do licznej grupy naturalnych antybiotyków polieterowych, które były przedmiotem wieloletnich badań prowadzonych między innymi przez promotora i promotora pomocniczego. Jonofory polieterowe cechują się unikalną budową chemiczną, która sprawia, że są one zdolne do kompleksowania kationów metali i transportowania ich przez błony biologiczne komórek. Cecha ta sprawia, że wykazują one wielorakie działanie biologiczne, w tym aktywność przeciwbakteryjną, przeciwmalaryczną i przeciwnowotworową.

Kwas lasalowy jest obecnie komercyjnym antybiotykiem weterynaryjnym, pełniącym rolę stymulatora wzrostu bydła.

Temat pracy przedstawionej do recenzji należy do nowatorskich i wybrany został trafnie w kontekście ważnych badań strukturalnych, spektroskopowych i wyznaczania aktywności biologicznych nowych pochodnych związków pochodzenia naturalnego. Poszukiwanie korelacji pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością biologiczną jest tematem wciąż aktualnym, gdyż tylko poznanie realnej struktury związków organicznych prowadzić może do racjonalnego projektowania takich ich pochodnych, które mieć będą lepsze właściwości terapeutyczne.

Pod względem formalnym praca doktorska ma klasyczny układ treści, tj. cel pracy (2 str.), część teoretyczna (36 str.), badania własne (43 str.), część eksperymentalna (9 str.), podsumowanie i wnioski (4 str.) oraz spis cytowanej literatury obejmujący 223 pozycje literaturowe (14 str.).

Cel pracy mgr J. Rutkowski sformułował w sposób jasny i precyzyjny. Pragnął on otrzymać serię kompleksów kwasu lasalowego z aminami i określić ich strukturę w stanie krystalicznym i w roztworze, a zwłaszcza ocenić rolę wiązań wodorowych w stabilizacji tych struktur.

W części teoretycznej mgr J. Rutkowski scharakteryzował w skondensowany sposób antybiotyki jonoforowe, szczególny nacisk kładąc na karboksylowe jonofory polieterowe, do grupy których zaliczany jest kwas lasalowy – obiekt badań Doktoranta. Rozdział ten napisany jest z polotem, pozwalając czytelnikowi zrozumieć szeroki kontekst naukowy związany z badaniami polieterowych jonoforów. Przedstawiona została struktura najważniejszych z nich, mechanizm działania biologicznego oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa. Następnie opisany został obecny stan wiedzy odnośnie kwasu lasalowego i jego pochodnych, w szczególności wyniki dotychczasowych badań strukturalnych kwasu lasalowego i jego kompleksów z kationami metali oraz różnych pochodnych tego związku.

Narracja części teoretycznej oraz jej wszechstronność umacnia mnie w opinii, iż mgr Jacek Rutkowski jest doskonale zorientowany w tematyce badań, których się podjął. Doskonale zdaje On sobie sprawę z wpływu struktury pochodnych kwasu lasalowego na ich aktywność biologiczną. Doktorant nie ustrzegł się on jednak drobnych błędów, np. na rys. 22 opisującym syntezę totalną kwasu lasalowego (str. 30) związek podpisany jako kwas lasalowy, jest jego benzylovym estrem. Ponadto zauważyłem, że na tym rysunku, podpisy są i po polsku i po angielsku. Dla przejrzystości zawsze lepsza jest homogenizacja języka.

Wartym podkreślenia jest zdanie, w którym autor skromnie (moim zdaniem zbyt skromnie) napisał: „*Budowę oraz właściwości biologiczne antybiotyków polieterowych omówiłem szczegółowo w pracy przeglądowej [105], do której odsyłam czytelnika w celu uzyskania dalszych informacji.*” Wspomniana praca jest poważnym artykułem przeglądowym (31 str.), pt.: “Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics” opublikowanym w *BioMed Res. International* (IF=2.44). W artykule tym mgr Rutkowski jest pierwszym autorem i zarazem autorem korespondencyjnym, co potwierdza moją wcześniejszą opinię o tym, iż jest On doskonale zorientowany w tematyce polieterowych jonoforów

W rozdziale opisującym badania własne Doktorant przedstawił wyczerpująco wyniki i dyskusję badań spektrometrycznych ESI-MS oraz spektroskopowych przeprowadzonych przy użyciu  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR, widm dwuwymiarowych: COSY, HETCOR, HMBC, jak również wyniki badań dyfraktometrycznych dla siedmiu nowych krystalicznych kompleksów kwasu lasalowego z aminami, wraz z opisem aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej wybranych związków. Jak wynika z przedstawionego materiału,

wybór amin był przemyślany i pozwolił na przeanalizowanie wpływu struktury amin na parametry wiązań wodorowych w badanych kompleksach. Modelowymi aminami, które Doktorant wybrał do badań były: *N*-butyloamina (amina alifatyczna), alliloamina (amina nienasycona z wiązaniem podwójnym), propargiloamina (amina nienasycona z wiązaniem potrójnym), anilina (amina aromatyczna), benzyloamina (amina aromatyczno-alifatyczna). Poza tym otrzymał On kompleks kwasu lasalowego jonem amonowym oraz tetrametyloguanidyną (silną zasadą azotową). Do wyznaczenia stechiometrii kompleksów wykorzystana została spektrometria masowa z jonizacją ESI. Badania te pokazały, że zawsze tworzą się kompleksy o stechiometrii 1:1.

Struktura wszystkich siedmiu krystalicznych kompleksów została wyznaczona metodą dyfraktometryczną, przy współpracy z krystalografami: prof. Janem Janczakiem z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu oraz z prof. Andrzejem Katrusiakiem i dr Małgorzatą Ratajczak-Sitarz z Wydziału Chemii UAM. Parametry opisujące wiązania wodorowe obecne w tych kompleksach zostały zestawione w Tabeli 4. Badanie krystalograficzne pokazały, że w strukturach wszystkich kompleksów grupa karboksylowa kwasu lasalowego w ciele stałym jest zawsze zdeprotonowana, a atom azotu grupy aminowej sprotonowany. Natomiast wiązania wodorowe pełnią decydującą rolę w stabilizacji struktur tych kompleksów. Z jednej strony wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe stabilizują pseudo-cykliczną konformację anionu kwasu lasalowego, a z drugiej strony protonowana amina  $R-NH_3^+$  lub jon amonowy  $NH_4^+$  są kompleksowane wewnątrz anionu kwasu lasalowego słabymi międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorami. Najsilniejsze wiązanie wodorowe o charakterze pseudo-aromatycznym zostało zaobserwowane w salicylowym fragmencie cząsteczki anionu kwasu lasalowego.

Interesujące jest zawsze porównanie struktur kompleksów stabilizowanych wiązaniami wodorowymi w ciele stałym ze strukturami obecnymi w roztworze. Zadanie takie postawił sobie również mgr J. Rutkowski. W kolejnej części dysertacji opisuje On zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1H$ - i  $^{13}C$  NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni w badaniach struktury kompleksów kwasu lasalowego z aminami w roztworze chloroformowym. Widma  $^1H$  NMR dostarczyły informacji na temat siły wiązań wodorowych tworzonych przez grupy hydroksylowe anionu kwasu lasalowego. Natomiast metodę  $^{13}C$  NMR wykorzystano do określenia zaangażowania atomów tlenu cząsteczki anionu kwasu lasalowego w proces kompleksowania protonowanej aminy. Doktorant sprawnie posługuje się językiem spektroskopowym. Jednoznaczne przypisanie sygnałów w widmach NMR tak skomplikowanych kompleksów możliwe było dzięki

wykorzystaniu szeregu zawansowanych korelacyjnych technik dwuwymiarowych, takich jak: COSY, HETCOR i HMBC, których przykładowe widma Autor pokazał na odpowiednich rysunkach. Nie rozumiem zestawienia widm węglowego rezonansu jądrowego na Rys. 46 czy 63, gdyż obserwowane zmiany położenia sygnałów są zbyt małe aby móc je zauważyć na tych rysunkach. W tym przypadku opis zawarty w Tabelach 5-13 jest wystarczający i jasny. Ze wspomnianych rysunków widać, że związki które badał Doktorant były spektroskopowo czyste.

Techniką niezwykle użyteczną w badaniach wiązań wodorowych jest spektroskopia w podczerwieni. Promotorzy doktoratu są uznanymi autorytetami naukowymi w tej dziedzinie. Na podkreślenie zasługuje perfekcyjne opracowanie tego fragmentu doktoratu. Piękne zestawienia widm, zmierzonych dla krystalicznych kompleksów i ich chloroformowych roztworów pozwoliły na jednoznaczne wykazanie, że w przypadku większości badanych kompleksów struktura obecna w ciele stałym nie zmienia się przy przejściu do roztworu, tym samym dowodząc stabilności tych kompleksów. Jedyny wyjątek stanowi kompleks kwasu lasalowego z aniliną, który w roztworze chloroformowym częściowo dysocjuje z odtworzeniem kwasu lasalowego i nieprotonowanej aminy. Spektroskopia IR okazała się być tutaj najlepszą metodą dla obserwowania takiego zjawiska.

Ze swojej wieloletniej praktyki wiem, że pomiary IR w roztworach nie należą do trywialnych, a wręcz przeciwnie są niezwykle wymagające. Dlatego bardzo wysoko oceniam tę część doktoratu mgr Jacka Rutkowskiego.

Kompleksowe zastosowanie wymienionych wcześniej metod spektroskopowych pozwoliło Doktorantowi również na wykazanie możliwości tworzenia kompleksów kwasu lasalowego z aminami nawet w obecności konkurujących kationów metali jednowartościowych ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ) oraz wykazanie istnienia równowagi między takimi kompleksami. Kompleksy kwasu lasalowego z aminami będą zatem relatywnie stabilne również w środowisku komórkowym (w obecności jonów obcych).

Kwas lasalowy to aktywny biologicznie antybiotyk. Dlatego interesujące są wyniki badań wpływu aminy na aktywność przeciwbakteryjną tego związku. We współpracy z dr Joanną Stefańską z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego określona została aktywność 4 kompleksów. Badanie te wykazały, że kompleksowanie aminy nie wpływa zasadniczo na aktywność przeciw bakteriom Gram-dodatnim. Można by oczekiwać efektu addytywności lub synergicznego w przypadku zastosowania aktywnych przeciwbakteryjnie amin. Tematyka ta może stanowić wyzwanie w okresie po doktoracie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że po raz pierwszy wykazano również aktywność kwasu lasalowego i jego pochodnych wobec

antybiotyko-opornym szczepom Gronkowca złocistego, które to bakterie są utrapieniem niejednego szpitala w Polsce i które niezwykle trudno zwalczyć tradycyjną antybiotykoterapią.

Ostatnio intensywnie prowadzone badania *in vitro* oraz badania kliniczne wykazały, iż jeden z antybiotyków jonoforowych – salinomycynę można z sukcesem stosować jako lek przeciwnowotworowy. W świetle tych doniesień kolejnym istotnym wynikiem pracy doktorskiej mgr Jacka Rutkowskiego było wykazanie po raz pierwszy, że kwas lasalowy posiada niemałą aktywność przeciwnowotworową wobec ludzkich komórek nowotworowych (raka płuc, raka piersi, raka okrężnicy czy mysiej białaczki). Podobną aktywność wykazały również dwa kompleksy kwasu lasalowego z aminami. Rezultaty te mają niewątpliwie charakter pionierski.

Rozprawę doktorską kończy skrupulatny opis przeprowadzonych eksperymentów oraz podsumowanie i wnioski. Mgr J. Rutkowski zrealizował wszystkie wyznaczone cele, a uzyskane wyniki są ciekawe, dobrze opisane i nowatorskie. Widać łatwość Doktoranta w posługiwaniu się metodami spektroskopowymi oraz dużą wiedzę na temat antybiotyków jonoforowych.

Wyniki badań kompleksów kwasu lasalowego z aminami przeprowadzonych przez Doktoranta posłużyły jako materiał trzech publikacji, które ukazały się w *Journal of Molecular Structure* (IF=1,61). Mgr Jacek Rutkowski opublikował również w *BioMed Research International* (IF=2.44) wspomnianą wyżej pracę przeglądową o antybiotykach polieterowych, a także prezentował trzykrotnie rezultaty swoich badań dotyczących kompleksów kwasu lasalowego z aminami na międzynarodowych konferencjach naukowych. Ponadto Doktorant uczestniczył także w innych badaniach prowadzonych w Zakładzie Biochemii, czego rezultatem jest współautorstwo w kolejnych dwóch publikacjach, które ukazały się w *Structural Chemistry* (IF=1.85) oraz w *Spectrochimica Acta, Part A* (IF=2.1).

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr Jacka Rutkowskiego pt. "*Badania spektroskopowe, strukturalne i aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowych soli kwasu lasalowego z aminami*" spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim w aktualnej Ustawie. Dlatego też z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Jacka Rutkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pragnę również z całym przekonaniem pokreślić, że praca doktorska mgr J. Rutkowskiego zasługuje na wyróżnienie.

