



Opole 18 września 2017

dr hab. Jacek Lipok, prof. UO

### OCENA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik,  
pt.: „Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena aktywności biologicznej nowych  
pochodnych graminy ”

wykonanej w Pracowni Chemii Związków Heterocyklicznych  
Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,  
pod opieką prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz

Gramina jest naturalnym alkaloidem roślinnym obecnym nie tylko w łądziejach i ulistnieniu roślin trawiastych, spośród których najbardziej znanymi źródłami tej substancji są lasecznicza trzinowata i zboża z rodzaju *Hordeum* (np. jęczmień), ale także w liściach klonu srebrzystego. Występując w tkankach roślin, gramina pełni głównie rolę deterenta i toksyny pokarmowej zwierząt roślinożernych. Literaturowe wartości  $LD_{50}$  wskazują, że substancja ta jest trucizną dla zwierząt stałocieplnych. Fakt ten (toksyczność) jest znakomitą rekomendacją do poszukiwań leczniczych aspektów stosowania graminy i jej pochodnych. Tym bardziej, że natura chemiczna tego związku, opisana w pewnym stopniu nazwą systematyczną: 3-(*N,N*-dimetyloaminometyleno)indol, wskazuje na znaczące podobieństwo strukturalne do całej gamy związków psychoaktywnych, dobrze transportowanych w organizmach zwierząt i co istotne przenikających barierę krew-mózg. Substancje posiadające wspomniane cechy są z natury predestynowane do zastosowania w terapii medycznej.

Dlatego też, tok badań Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik, zwieńczony formalnie przekazaną mi do oceny rozprawą doktorską, uważam za naturalną konsekwencję zainteresowań naukowych chemika, wykorzystującego świat przyrody jako źródło niestającej inspiracji.

Zgodnie z informacjami podanymi przez Autorkę, zasadniczym celem przeprowadzonych przez Nią badań, była synteza nowych pochodnych graminy, utworzonych w wyniku modyfikacji strukturalnych tego alkaloidu, głównie w pozycjach C10 oraz N1. Takie podejście pozwoliło na uzyskanie łącznie czterdziestu dziewięciu (49)

pochodnych, które Doktorantka zaklasyfikowała do pięciu grup: (I) etery alifatyczne indolo-3-karbinolu (I3C) oraz *N*-acetylo pochodne, (II) pochodne z układami heterocyklicznymi, (III) koniugaty graminy z uracyłem i jego pochodnymi, (IV) pochodne zawierające pierścień triazolowy otrzymane w wyniku reakcji „chemii klik” oraz (V) sole graminy z pochodnymi kwasów żółciowych. Chociaż zróżnicowanie strukturalne zsyntezowanych związków, wymagające prawdziwej biegłości w syntezie organicznej, budzi podziw, pewien niedosyt pozostawia brak wyraźnie wyartykułowanego kryterium (kryteriów) wyboru kierunków modyfikacji przyjętych przez Autorkę. Oczywiście przesłanką jest ciekawość badacza, która w moim przekonaniu jest wystarczającym powodem prowadzenia badań naukowych. Jednak w przypadku syntezy związków cechujących się potencjalną aktywnością terapeutyczną, warto odnieść przyjęty kierunek modyfikacji wyjściowej struktury, do określonego sposobu działania pochodnej, wykorzystując np. metodę QSAR. Tym bardziej, że niektóre elementy tej metody Autorka zastosowała, o czym świadczą dane przedstawione w podrozdziałach związanych z modelowaniem molekularnym. Byłbym zatem wdzięczny, gdyby Doktorantka zechciała wyraźnie sformułować kryteria wyboru kierunków przeprowadzonych przez Nią modyfikacji strukturalnych graminy, w odniesieniu do potencjalnego działania określonych pochodnych w układach biologicznych, gdzie obecność tych połączeń może skutkować np.: zaburzeniami transportu transbłonowego, zmianą przewodzenia impulsów nerwowych, hamowaniem aktywności określonych enzymów, indukcją procesu apoptozy, czy zaburzeniami procesu translacji.

Odnosząc się do kompozycji pracy doktorskiej Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik można stwierdzić, że pełny opis przeprowadzonych prac eksperymentalnych i wyników toku badań związanych bezpośrednio z celem rozprawy, stanowi zdecydowaną większość – około  $\frac{3}{4}$  objętości dysertacji, co obrazuje wybitnie eksperymentalny charakter Jej naukowych dociekań. Kompozycja pracy, liczącej dwieście dwadzieścia cztery (224) numerowane strony, jest klasyczna dla tego rodzaju opracowań, a racjonalny podział na rozdziały o określonym charakterze przekazu, ułatwia śledzenie wywodów Doktorantki, mimo obszerności rozprawy. Dobrze ułożone informacje graficzne: czterdzieści dwa (42) rysunki, trzydzieści dziewięć (39) schematów i osiem (8) wykresów, bardzo dobrze spełniają swoją rolę i w niebagatelny sposób wpływają na estetykę szaty graficznej dysertacji. Z kolei dwadzieścia osiem (28) tabel zawiera syntetycznie podane zestawienia, w zdecydowanej większości istotnych danych. Chciałbym też wspomnieć o użytecznych, estetycznie przygotowanych na odrębnych laminowanych kartach, schematach syntezy poszczególnych grup pochodnych, będących formą podsumowania kolejnych etapów badań.

Biorąc pod uwagę również stronę merytoryczną opracowania, warto wspomnieć o zastosowaniu przez Doktorantkę tego samego schematu prezentacji cech wszystkich pięciu

(V) odrębnych strukturalnie grup pochodnych, co ułatwia wskazanie różnic i podobieństw poszukiwanych właściwości tych substancji. W tym kontekście, pewien niedosyt pozostawia brak krótkich, kilkudzaniowych podsumowań po każdym z podrozdziałów, w których znalazłyby się informacje wiążące zakres i intensywność omawianych aspektów aktywności biologicznej, ze strukturą odpowiednich pochodnych.

W sposobie przedstawienia wyników badań własnych Autorki, zwraca uwagę także wyróżnienie pochodnych grup III i V, dla których utworzono specjalne podrozdziały „Modelowanie molekularne i ocena aktywności biologicznej ....”. Ponieważ umknął mi szczególny powód takiego wyróżnienia, będę wdzięczny za wyjaśnienie tej kwestii.

Merytoryczną wartość pracy doktorskiej Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik determinuje pełny opis przeprowadzonych syntez pochodnych graminy, oczyszczania powstających produktów i ustalenia ich struktur z wykorzystaniem metod spektroskopowych, a w przypadku uzyskania pochodnych krystalicznych, także metod krystalograficznych. Podejście Autorki do rozwiązania poszczególnych problemów pojawiających się w tej części badań, świadczy o bardzo dobrym opanowaniu warsztatu syntezy organicznej, co potwierdza właściwy dobór zastosowanych z sukcesem metod. Na uznanie zasługuje kontrola przebiegu procesu na każdym etapie syntezy, również dzięki wykorzystaniu niedocenianej przez wielu młodych chemików chromatografii cienkowarstwowej TLC. Docenić należy także dążenie Autorki do wyjaśnienia efektywności otrzymywania poszczególnych pochodnych, w oparciu o obliczone wartości ciepła tworzenia (HOF) tych substancji oraz elementy topologii ich molekuł. Wartość dodaną wniosły elementy modelowania molekularnego i predykcji aktywności uzyskanych pochodnych, przeprowadzone *in silico*. Warto podkreślić, iż do tego celu Autorka wykorzystwała ogólnodostępne, podstawowe narzędzia wspomagające pracę chemika zainteresowanego aktywnością biologiczną substancji; program „Molinspiration” oraz predykcyjną bazę danych PASS. Wyniki tych działań pozwoliły Jej określić hipotetyczny zakres i intensywność oddziaływania zsyntezowanych pochodnych. Wartość wyników predykcji *in silico* często staje się przedmiotem dyskusji z racji stosowanych algorytmów, które wciąż wymagają ulepszenia. Dowodem na to jest zsyntezowana przez Doktorantkę pochodna **2**, której rzeczywista aktywność wobec linii komórek nowotworowych pozytywnie odbiega od wyników predykcji, uzyskanych z wykorzystaniem metod obliczeniowych. Wspomnieć należy, iż część badań związanych z oceną wybranych aspektów aktywności biologicznej zsyntezowanych połączeń, Autorka zrealizowała we współpracy z jednostkami zewnętrznymi; Zakładem Biologii Komórki, Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii UAM oraz Zakładem Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Eksperymenty te dotyczyły oceny właściwości przeciwutleniających i utleniająco-redukujących pochodnych, ocenę ich aktywności ograniczającej proliferację i rozwój komórek

linii nowotworowych, a także wstępne określenie bezpieczeństwa stosowania tych substancji w testach na komórkach erytrocytów. Efektem umiejętnej współpracy Doktorantki z badaczami zajmującymi się oceną aktywności biologicznej, jest imponujący zbiór danych, które w przeciwieństwie do charakterystyki chemicznej produktów syntez, zinterpretowano nieco powierzchownie.

Uważna lektura rozprawy, zgodna z tokiem narracji zaproponowanym przez Autorkę sprawiła, że pewne, poruszone przez Nią kwestie skłoniły Recenzenta do sformułowania poniższych uwag, które (co pragnę podkreślić) mają charakter dyskusyjny:

str. 9 Formułując cel pracy Autorka (po raz kolejny) używa terminu „analiza *in silico*”, co w moim odczuciu jest pewnym nadużyciem znaczenia tego zwrotu. Omówione później działania można uznać co najwyżej za wspomagane metodami obliczeniowymi przewidywanie (predykcję) aktywności substancji, w oparciu o podobieństwo do struktur już pod tym względem zweryfikowanych. Podobne zastrzeżenia budzi stosowany w omówieniu wyników badań termin; „prowadzić badania aktywności biologicznej *in silico*”.

str. 14 Niefortunne zestawienie cech indolu, który w myśl słów Autorki najpierw „Działa toksycznie w kontakcie ze skórą ...”, a w kolejnej części zdania „...drażni skórę, oczy, drogi oddechowe.” dowodzi, jak istotne jest odnoszenie efektów działania substancji do jej stężenia, dawek etc..

str. 19 Autorka podaje błędną informację o biosyntezie pożądaných alkaloidów przez „szczepy sporyszu”. Sporysz jest formą przetrwalnikową (*Sclerotium clavus*) buławinki czerwonej (*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.), grzyba infekującego wiele gatunków roślin trawiastych, w tym zboża. Intensywność procesów metabolicznych zachodzących w strukturach form przetrwalnikowych, jest ograniczona do niezbędnego minimum, a substancje występujące w sporyszu, biosyntezowane i gromadzone są wcześniej. Poprawna informacja powinna odnosić się do wyselekcjonowanych szczepów buławinki czerwonej, a nie sporyszu.

str. 21 Na Rysunku 3 pojawia się struktura związku opisanego, jako „ICZ”, którego Autorka nie omawia w tym podrozdziale dysertacji. Stosowanej informacji brakuje także w objaśnieniu rysunku.

str. 27 Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem Doktorantki, w myśl którego reakcja Mannicha - trójskładnikowa synteza biomimetyczna „...jest wykorzystywana w biosyntezach wielu alkaloidów i porfiryn.” Wspomniana synteza to raczej procedura laboratoryjna, naśladowująca z

dobrym skutkiem, prawdopodobne, naturalne przemiany wiodące do uzyskania m.in. graminy.

str. 46-47 Jak sądzę odpowiednie widma NMR graminy (rys. 7 i 8) są wynikiem pomiarów związku otrzymanego przez Doktorantkę. Nie rozumiem zatem, dlaczego dane podane w tabeli 5 (wartości przesunięć chemicznych, multipletowość), zostały zaczerpnięte z internetowej (przynaję przyzwoitej) bazy danych. Jeżeli zaś wyniki pomiarów Autorki zostały jedynie zweryfikowane w oparciu o wspomnianą bazę, to fakt ten warto zaznaczyć w objaśnieniu tabeli 5 wyraźniej, niż poprzez dołączenie odnośnika literaturowego. Jest też niezwykle mało prawdopodobne, żeby dokładność podanych wartości przesunięć chemicznych sygnałów atomów węgla  $^{13}\text{C}$  – setne części ppm, można było uzyskać przy częstotliwości 25MHz, podanych przez Autorkę w objaśnieniach tabeli 5.

str. 51 Czy Autorka rozważała inny, niż zaproponowany (schemat 21) mechanizm reakcji bezwodnika kwasu octowego z reaktywnym produktem przejściowym 3-metylenoindolem? Posługując się metodami modelowania molekularnego można np. sprawdzić, czy ze względu na odległości centrów reakcji i sztywność struktury indolu, równoczesne zaangażowanie dwóch cząsteczek bezwodnika; w rejonie C10 oraz w rejonie N1, nie jest bardziej korzystne termodynamicznie.

str. 52 Jest mało prawdopodobne, by przy zastosowanej metodzie jonizacji (EI) jon molekularny  $\text{M}^+$  N-acetylo-3-acetoksymetylenoindolu charakteryzujący się wartością m/z około 231, był najbardziej intensywnym (100%) rejestrowanym jonem. Świadczy o tym również widmo EI MS tej substancji, stanowiące część rysunku 10.

str. 63 Nie jest dla mnie jasne stwierdzenie Doktorantki rozpoczynające się od słów: „Wartość współczynnika podziału nie zależy od rozpuszczonej substancji aktywnej ...”. Tym bardziej, że na stronie 64 Autorka podaje zależność pomiędzy wartością  $\log P_{ow}$  i hydrofilowością/lipofilowością związków. Byłbym zatem wdzięczny za wyjaśnienie od jakich czynników i w jakim zakresie zależy wartość współczynnika podziału  $\log P_{ow}$  związku chemicznego.

str. 69 Stwierdzenie „3-Etoksy I3C może stymulować ...” i dalej „...oraz wpływać na syntezę genu kodującego białko Cytochrom P450.” uważam za dyskusyjne. Materiał genetyczny w istniejących i funkcjonujących komórkach jest już „zsyntezowany”. Zmiany wywoływane działaniem czynników chemicznych zachodzą w procesie ekspresji genu, a nie na etapie syntezy DNA. Oczywiście możliwe są zmiany w strukturze DNA z wykorzystaniem

zaawansowanych narzędzi biologii molekularnej np. metody CRISPR, ale nie sądzę, by Autorka sugerowała takie działanie etoksylowej pochodnej I3C.

*str. 103* Nie znalazłem wyjaśnienia, dlaczego stężenie koniugatów graminy z uracylem (grupa III) i jego pochodnymi, które poddano ocenie aktywności biologicznej, różniło się dwukrotnie od stężenia pochodnych I i II grupy.

Uważna lektura przedstawionej mi do oceny, obszernej i dobrze napisanej rozprawy sprawiła, że znalazłem w tekście nieliczne błędy natury edytorskiej, które z obowiązku recenzenta przytaczam mając nadzieję, że pomogą w edycji kolejnych form upublicznienia wyników badań Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik. Wymieniam jedynie te, które w mojej ocenie mogą wpływać na klarowność przekazu:

*str. 17, schemat 7* - struktura opisana jako 5-Acetyloserotonina jest w istocie wzorem N-acetyloserotoniny – bezpośredniego prekursora melatoniny

*str. 39* – podana wartość  $EC_{50}$  graminy dla bardziej zagęszczonych skupisk sinic wynosi raczej 2,1 mg/L, a nie 2,1 mg/mL

*str. 65* – oznaczenia liczby HD potencjalnych donorów wiązań wodorowych - (O-N) oraz HA, liczby potencjalnych akceptorów wiązań wodorowych - (OH-NH) podane w tekście, różnią się od tych podanych w tabeli 8. Uwzględniając strukturę pochodnych, których cechy przedstawiono w tabeli 8, oznaczenia na stronie 65 są podane błędnie.

*str. 66, tabela 8* – nie jest możliwe, żeby masy molowe pochodnych 9 i 10, różniących się liczbą atomów nie będących wodorami, były identyczne – prawdopodobnie efekt „kopiuj-wklej”

*str. 97, tabela 16* – wartości analogicznych kątów torsyjnych w strukturach pochodnych 17, 20, 21, 22, podano, z niewiadomego powodu, z bardzo różną dokładnością, ponadto z pominięciem kwestii cyfr znaczących.

*str. 105, tabela 19* – mimo odpowiedniej informacji w nagłówku tabeli odnośnie wartości odchylenia standardowego SD towarzyszących podanym średnim np. Akt. przeciwutl. [AA%±SD], wartości tych nie podano w tej tabeli.

*str. 106, tabela 20* – z pewnością chodzi o pochodną **16**, a nie **15** jak podaje Autorka

*str. 112, schemat 31* – numer procedury VI powinien znajdować się za, a nie przed nazwą produktu **38**

Wyrażone wyżej wątpliwości i uwagi, w żaden sposób nie rzutują na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej, która odzwierciedla logiczny tok przeprowadzonych badań; począwszy od syntezy i charakterystyki spektroskopowej nowych pochodnych

graminy, poprzez predykcję *in silico*, po rzeczywistą ocenę aktywności biologicznej uzyskanych połączeń. W ocenie dysertacji Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik, uwzględniam także Jej dotychczasowy dorobek naukowy, na który składają się trzy (3) wydane publikacje w tym dwie (2) w czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej z tzw. listy A MNiSW, gotowe manuskrypty dwóch kolejnych publikacji, sześć (6) wystąpień konferencyjnych – w większości na konferencjach krajowych oraz trzymiesięczny zagraniczny staż badawczy w ramach programu Erasmus.

Doceniając walory rozprawy doktorskiej Pani mgr Weroniki Kozaneckiej-Okupnik, chciałbym stwierdzić, że opracowanie to jest rezultatem oryginalnej pracy badawczej Autorki. Efektem działań podjętych przez Doktorantkę jest zbiór niespełna pięćdziesięciu nowych, wstępnie scharakteryzowanych alkaloidów indolowych, spośród których kilka posiada godną uwagi aktywność terapeutyczną.

W moim przekonaniu, niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Pani mgr. Weroniki Kozaneckiej-Okupnik do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

