

Załącznik nr 2

do wniosku o przeprowadzenie postępowania w sprawie
nadania stopnia doktora habilitowanego

Autoreferat

Dr inż. Marcelina Mazur

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 2023

Spis treści

1. Dane osobowe:.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne.	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	17
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	27
7. Omówienie pozostałych osiągnięć	31

1. Dane osobowe:

Imię i nazwisko: Marcelina Mazur

Miejsce zatrudnienia:

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Katedra Chemii Żywności i Biokatalizy

Ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne.

02.02.2006 - Inżynier w zakresie biotechnologii żywności, Akademia Rolnicza we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), Wydział Nauk o Żywności

03.07.2007 - Magister inżynier biotechnologii w zakresie biotechnologii żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności

13.03.2012 - Doktor nauk biologicznych w zakresie biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności, rozprawa doktorska pt. "Synteza i mikrobiologiczne przekształcenia chlorowcolaktonów" wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Czesława Wawrzeńczyka

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

15.09.2011 - asystent w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

01.10.2016 – adiunkt w Katedrze Chemii (obecnie Chemii Żywności i Biokatalizy) Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Tytuł osiągnięcia naukowego:

BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA BIOLOGICZNE AKTYWNYCH ZWIĄZKÓW Z UGRUPOWANIEM LAKTONOWYM

Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

L.p.	Publikacja	IF ^a	Punkty MEiN ^b
P-1	M. Mazur* , W. Gładkowski, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, G. Maciejewska, C. Wawrzeńczyk „Microbial asymmetric functionalization of β -cyclocitral-derived tetramethyl-substituted γ -lactone” <i>Molecules</i> , 2019, 24, 666; DOI:10.3390/molecules24040666	3.267	100
P-2	M. Mazur* , A. Włoch, F. Bahri, H. Pruchnik, A. Pawlak, B. Obmińska-Mrukowicz, G. Maciejewska, W. Gładkowski, Chemoenzymatic synthesis of enantiomeric, bicyclic δ -halo- γ -lactones with a cyclohexane ring, their biological activity and interaction with biological membranes, <i>Biomolecules</i> , 2020, 10(1), 95; DOI:10.3390/biom10010095	4.879	100
P-3	M. Mazur* , A. Kudryńska, A. Pawlak, B. Hernandez-Suarez, B. Obmińska-Mrukowicz, W. Gładkowski, Biotechnological approach for the production of enantiomeric hydroxylactones derived from benzaldehyde and evaluation of their cytotoxic activity, <i>Catalysts</i> 2020, 10, 1313; DOI:10.3390/catal10111313	4.146	100
P-4	M. Mazur* , T. Janeczko, W. Gładkowski, Lipase-mediated Baeyer–Villiger oxidation of benzylcyclopentanones in ester solvents and deep eutectic solvents, <i>Scientific Reports</i> , 2022, 12, 14795; DOI:10.1038/s41598-022-18913-2	4.996	140
P-5	M. Mazur* , D. Masłowiec, Antimicrobial activity of lactones, <i>Antibiotics</i> 2022, 11(10), 1327; DOI:10.3390/antibiotics11101327	5.222	70
P-6	M. Mazur* , K. M. Zych, B. Obmińska-Mrukowicz, A. Pawlak, Microbial transformations of halolactones and evaluation of their antiproliferative activity, <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 2023, 11, 1327; DOI: 10.3390/ijms24087587	6.208	140

^a Impact Factor podany jest dla roku opublikowania artykułu.

^b Punktacja MEiN podana dla roku opublikowania artykułu.

* Autor korespondencyjny

Omówienie celu naukowego osiągnięcia

Laktony to grupa związków szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, które bardzo często identyfikowane są jako metabolity wtórne roślin¹⁻³ lub mogą być izolowane z bakterii, grzybów, gąbek morskich lub innych organizmów^{4,5}. Chemicznie można je sklasyfikować jako wewnątrzcząsteczkowe estry kwasów hydroksykarboksylowych o różnej wielkości pierścienia. Ze względu na trwałość pierścienia, najczęściej spotykane są γ - i δ -laktony o pierścieniach pięcio- i sześcioczłonowych⁶. Jednakże różnorodność tej grupy związków jest niezwykle duża i można wśród nich odnaleźć przedstawicieli z pierścieniami trójczłonowymi⁷ oraz zawierających pierścienie makrocycliczne^{6,8}. Dodatkowo związki z ugrupowaniem laktonowym mogą mieć zróżnicowane szkielety węglowe a do pierścienia laktonowego mogą być przyłączone różne podstawniki alkilowe lub aryłowe, czego konsekwencją jest przynależność do zupełnie odmiennych klas związków⁹⁻¹¹.

Dzięki różnorodności struktur, która wpływa na wykazywane właściwości i aktywność biologiczną, laktony znajdują zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym jak i farmaceutycznym. Jako przykłady może posłużyć γ -dekalakton, który jest często komponentem aromatów owocowych. Jego enancjomer *S* występuje naturalnie w mango, natomiast enancjomer *R* znajduje się w różnych owocach, w tym brzoskwińiach¹². Lakton jaśminowy charakteryzuje się podobnym do jaśminu kwiatowo-owocowym zapachem, jest dobrze znany jako jeden z najważniejszych składników aromatu herbaty¹³. Makrocycliczne laktony o aromacie piżma znalazły zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym, a także jako substancje zapachowe stosowane w produktach kosmetycznych¹⁴.

Wiele związków laktonowych wykazuje również szereg innych niezwykle użytecznych właściwości biologicznych m. in. cytotoksycznych^{15,16}, przeciwbakteryjnych^{2,17,18}, przeciwgrzybiczych¹⁹, przeciw pasożytniczych¹, antyfidantnych²⁰ czy przeciwzapalnych^{11,21}. Od wieków w medycynie ludowej stosowano rośliny lecznicze i preparaty zawierające związki laktonowe²²⁻²⁴. Późniejsze badania naukowe pozwoliły powiązać obecność laktonów z wykazywanymi właściwościami biologicznymi i uzasadnić ich zastosowanie w etnofarmakologii. Związki z ugrupowaniem laktonowym mogą być stosowane jako leki na nadciśnienie tętnicze (eplerenon), malarię (artemizynina), łuszczycę (psoralen), a także jako antybiotyki (należące do makrolidów erytromycyna i azytromycyna) oraz leki przeciwnowotworowe (irynotekan)⁶.

Dotychczas powstało wiele prac przeglądowych, które opisują spektrum różnorodnych właściwości biologicznych²⁵⁻²⁷ związków laktonowych lub skupiających się głównie na właściwościach cytotoksycznych²⁸⁻³⁰. Natomiast tylko nieliczne opracowania dotyczą aktywności antybakteryjnej tej grupy związków. Stąd w **pracy P-5** został przedstawiony przegląd literatury pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej związków laktonowych o mniejszych pierścieniach – od czteroczłonowych β -laktonów do siedmioczłonowych ϵ -laktonów. Opisano przykłady izolowania bioaktywnych związków laktonowych ze źródeł naturalnych, głównie roślin, organizmów morskich oraz grzybów. Zaprezentowano przykłady dotyczące aktywności zarówno znanych od dawna związków takich jak artemizyna, helenalina, kostunolid czy partenolid ale i szeregu stosunkowo niedawno odkrytych połączeń. W pracy przedstawione są również różnorodne metody syntezy nowych związków z ugrupowaniem laktonowym. Oprócz klasycznych metody syntezy chemicznej zaprezentowano także przykłady zastosowania biotransformacji jako metody efektywnego otrzymywania tej grupy związków. Opisano również wybrane badania, w których testowano synergistyczną aktywność laktonów oraz

antybiotyków, szczególnie β -laktamowych. W chwili obecnej antybiotyki β -laktamowe nadal są grupą najczęściej stosowanych leków przeciwbakteryjnych³¹. Niestety pojawienie się szczepów opornych na te antybiotyki jest często związane z aktywnością β -laktamaz. Enzymy te hydrolizują wiązanie amidowe w pierścieniu laktamowym antybiotyku, co powoduje jego inaktywację. Dlatego intensywnie testowane są połączenia antybiotyków β -laktamowych z inhibitorami aktywności β -laktamaz, jako strategia zapewniająca skuteczniejsze działanie antybiotykoterapii^{32,33}. Osobny rozdział poświęcony jest też zjawisku *Quorum sensing* (QS). QS to specyficzna sygnalizacja, tzw. „porozumiewanie się” między komórkami, wykorzystywana przez bakterie do komunikacji, pozwalająca im funkcjonować jako populacja poprzez regulację ekspresji genów³⁴. Zjawisko to opiera się na syntezie i wydzielaniu do otoczenia cząsteczek sygnałowych zwanych autoinduktorami, w przypadku bakterii Gram-ujemnych najlepiej poznanymi związkami służącymi do tego celu są laktonowe pochodne homoseryny z różnymi grupami acylowymi przy atomie azotu (AHSL ang. acyl-homoserine lactones)^{35,36}. QS kontroluje różne aspekty patogenności, takie jak wrażliwość na antybiotyki, tworzenie biofilmu i adhezję komórek. Tak szeroki zakres aktywności regulowanych przez QS stanowi interesujący cel do projektowania nowych rodzajów substancji modulujących „zachowanie” bakterii, w tym także tych, które zdolne są do hamowania mechanizmów wpływających na patogenność tych drobnoustrojów³⁷. W pracy przedstawiono też przykład nowego związku Nafitromycyny (WCK 4873), który zastał otrzymany w trakcie realizacji programu poszukiwania leków w firmie Wockhardt. Jest to nowy środek przeciwdrobnoustrojowy z klasy ketolidów laktonowych, będący w fazie badań klinicznych jako antybiotyk podawany doustnie w leczeniu bakteryjnego zapalenia płuc i innych infekcji dróg oddechowych. Nafitromycyna jest klasyfikowana jako ketolid, ale ma dodatkowy pierścień γ -laktonowy i wykazuje silną aktywność przeciwko szczepom *Staphylococcus pneumoniae* opornym na makrolidy ale także *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* oraz umiarkowaną aktywność przeciwko *Haemophilus influenzae*³⁸⁻⁴¹.

Mimo, iż wiele z bioaktywnych laktonów może być izolowanych z materiału biologicznego, m.in. z roślin stosowanych w tradycyjnej medycynie ludowej, to jednak związki te występują zwykle w niewielkich ilościach w wyjściowej matrycy oraz w mieszaninach, w skład których wchodzi substancje o zbliżonej strukturze, co zdecydowanie utrudnia procesy ich separacji i oczyszczania. Dlatego też alternatywne metody ich otrzymywania cieszą się dużym zainteresowaniem. Biokataliza stała się jednym z rozwiązań, które znalazło zastosowanie zarówno na skalę laboratoryjną, jak i przemysłową⁴². Katalizatorami tych procesów są enzymy, które mogą być zamknięte w całych komórkach biokatalizatorów jak i oczyszczone lub immobilizowane. Atutem biokatalizacji jest mniejszy negatywny wpływ na środowisko z uwagi na to, że sam biokatalizator łatwo ulega degradacji. Reakcje prowadzone z udziałem biokatalizatorów zachodzą w łagodnych warunkach (nie wymagają zwiększonego ciśnienia oraz prowadzone są w temperaturach optymalnych dla biokatalizatora), co w konsekwencji wpływa na mniejszą energochłonność procesu. Dzięki biokatalizie możliwe jest otrzymywanie produktów trudnych do uzyskania na drodze tradycyjnej syntezy chemicznej a dodatkowo wysoka chemo- regio- i enancjoselektywność reakcji prowadzonych z udziałem biokatalizatorów jest kluczowym czynnikiem, niejednokrotnie decydującym o zastosowaniu tej metody⁴³.

Kierunek i przebieg katalizowanych procesów zależy nie tylko od selektywności działania biokatalizatora, ale także od wpływu szeregu czynników m.in. doboru środowiska reakcji⁴⁴. Przy wyborze rozpuszczalnika do reakcji należy uwzględnić nie tylko jego wpływ na postęp reakcji, ale także jego toksyczność, biodegradowalność, możliwość recyklingu i ponownego użycia oraz bezpieczeństwo

stosowania (np. łatwopalność i lotność). W ciągu ostatniej dekady zaproponowano wiele alternatywnych ekologicznych rozpuszczalników, spośród których można wymienić płyny w stanie nadkrytycznym, ciecze jonowe, pochodne glicerolu czy rozpuszczalniki głęboko eutektyczne (DES – deep eutectic solvents)^{45,46}.

Rozpuszczalniki głęboko eutektyczne to specyficzne mieszaniny dwóch lub więcej substancji, które przy pewnym stosunku molowym wykazują znaczne obniżenie temperatury topnienia, w porównaniu z czystymi związkami wyjściowymi. DES-y składają się zazwyczaj z czwartorzędowych soli amoniowych (akceptora wiązań wodorowych - HBA) - takich jak chlorek choliny i donorów wiązań wodorowych (HBD) takich jak cukry, kwasy karboksylowe lub mocznik. Obniżenie temperatury topnienia jest wynikiem tworzenia się wiązań wodorowych, ale pewną rolę mogą odgrywać również oddziaływania elektrostatyczne lub siły Van der Waalsa⁴⁷⁻⁴⁹. DES-y uważane są za "zielone rozpuszczalniki", łatwo ulegające biodegradacji, nietoksyczne, niedrogie i łatwe w przygotowaniu, a w ciągu ostatnich kilku lat cieszą się rosnącym zainteresowaniem jako rozpuszczalniki stosowane w procesach ekstrakcji, syntezy chemicznej lub biotransformacji^{48,50}.

Celem prac badawczych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego było zastosowanie biokatalizatorów w postaci zarówno całych komórek grzybów strzępkowych jak i enzymów do otrzymywania biologicznie aktywnych laktonów.

Cel główny zrealizowano poprzez następujące cele szczegółowe:

Cel szczegółowy 1: Zastosowanie lipaz na szlaku chemoenzymatycznej syntezy laktonów.

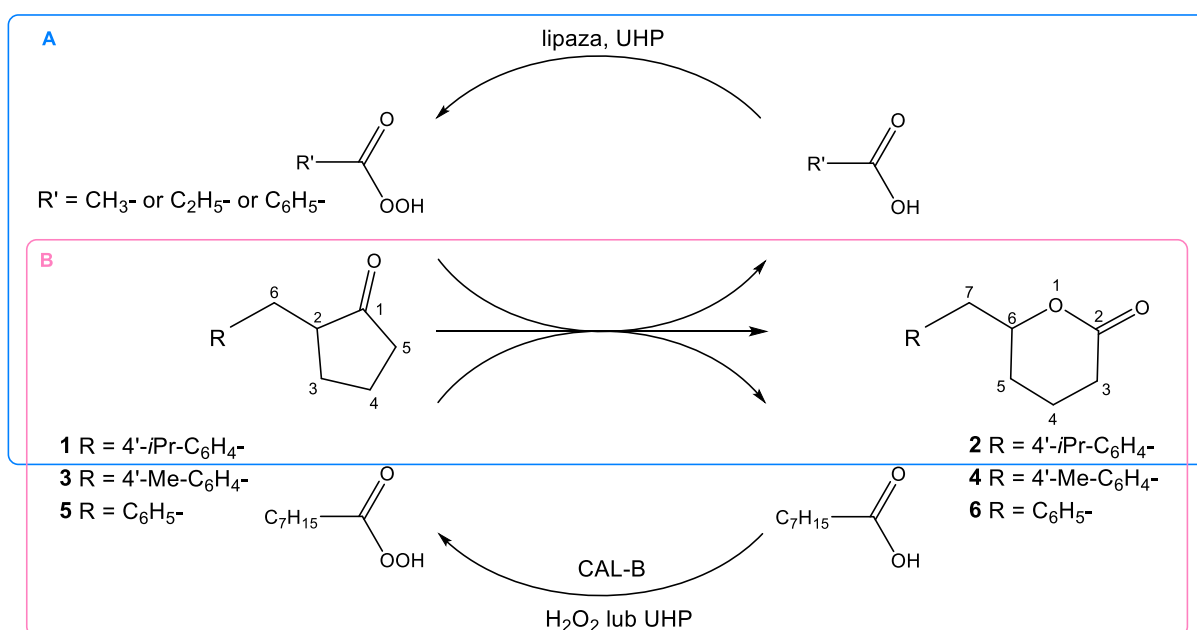
Cel szczegółowy 2: Zastosowanie grzybów strzępkowych jako efektywnych biokatalizatorów służących do otrzymywania nowych związków z ugrupowaniem laktonowym.

Prowadzone procesy biokatalizy okazały się w większości przypadków stereoselektywne, a część z uzyskanych laktonów charakteryzowała się wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Laktony otrzymane na drodze chemoenzymatycznej syntezy jak i biotransformacji były związkami nowymi, dlatego też ważnym aspektem było określenie ich właściwości biologicznych: głównie cytotoksycznych względem linii komórek nowotworowych ale też przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych czy oddziaływania na błony biologiczne.

Zastosowanie lipaz na szlaku chemoenzymatycznej syntezy laktonów

Jedną z metod otrzymywania związków z ugrupowaniem laktonowym jest reakcja utlenienia typu Baeyera-Villigera. Substraty tej reakcji to cykliczne ketony, a w jej wyniku atom tlenu wprowadzany jest pomiędzy atomami węgla w bezpośrednim sąsiedztwie grupy karbonylowej. Proces utleniania prowadzi się z użyciem nadkwasów organicznych w tradycyjnych rozpuszczalnikach, takich jak toluen czy dichlorometan⁵¹. Alternatywą dla syntezy chemicznej jest zastosowanie enzymów, wśród których często wymienia się monooksygenazy typu Baeyera-Villigera (BVMO). Enzymy te wymagają zastosowania NAD(P)H jako równoważnika redoks⁵², dlatego też alternatywą jest wykorzystanie lipaz, które nie wymagają jego użycia. Oprócz swojej tradycyjnej aktywności katalitycznej, która polega między innymi na hydrolizie wiązań estrowych, w wyniku której uwalniane

są kwasy karboksylowe i alkohole lub reakcji odwrotnej w warunkach niskiej zawartości wody, lipazy mogą być również stosowane jako biokatalizatory w reakcjach utlenienia. W chemoenzymatycznej reakcji typu Baeyera-Villigera, lipazy przy udziale nadtlenu wodoru katalizują powstawanie odpowiednich peroksy kwasów, które są następnie wykorzystywane w utlenianiu ketonów do laktonów. Zazwyczaj reakcje te prowadzi się w konwencjonalnych rozpuszczalnikach organicznych, takich jak octan etylu lub toluen^{51,53}. Alternatywnie, jako medium, można zastosować rozpuszczalniki głęboko eutektyczne. Badania prowadzone w ramach projektu Miniatura 3 (Zał. 3., II, 9.2.2.) i opublikowane w czasopiśmie *Scientific Reports* (**P-4**) dotyczyły właśnie możliwości zastosowania różnych rozpuszczalników w procesie chemoenzymatycznego utlenienia α -benzylocyklopentanonów do laktonów (Rysunek 1).



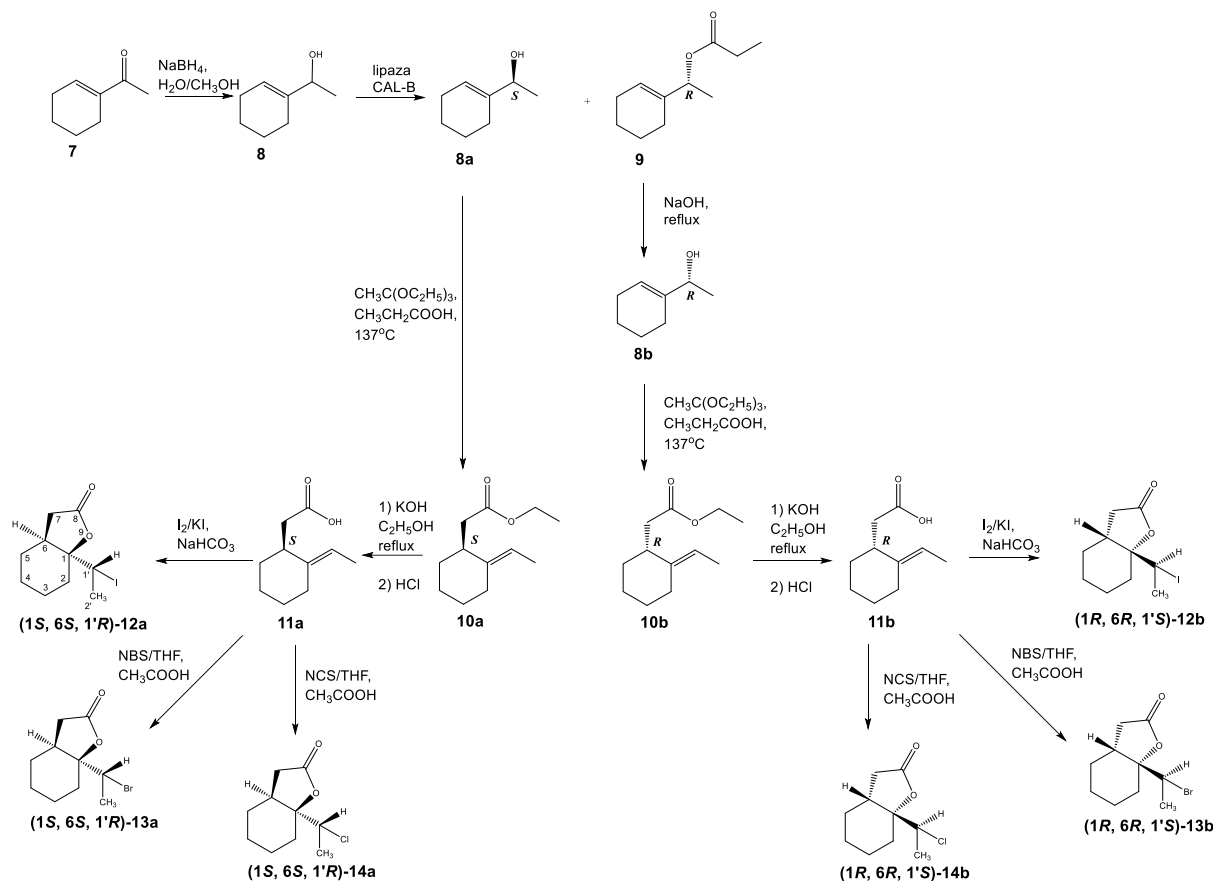
Rysunek 1. Chemoenzymatyczne utlenienie typu Baeyera-Villigera α -benzylocyklopentanonów: A) prowadzone w estrach; B) prowadzone w DES-ach.

Oprócz rodzaju rozpuszczalnika, sprawdzono również wpływ innych warunków reakcji, takich jak temperatura, rodzaj biokatalizatora oraz czynnika utleniającego na wydajność procesu. Biorąc pod uwagę lotność estrów stosowanych jako medium w reakcji utlenienia testowano trzy różne temperatury prowadzenia procesu 37, 45 i 55°C. Wraz ze wzrostem temperatury reakcja przebiegała szybciej, a najlepsze wyniki utleniania uzyskano w temperaturze 55°C. Najwyższą konwersję (46–47%) uzyskano w octanie etylu i benzoesanu etylu. Jednak, ze względu na niższą lotność i wyższą cenę benzoesanu etylu jako optymalny rozpuszczalnik wybrano octan etylu. Zbadano również możliwość zastosowania różnych biokatalizatorów. Oprócz lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B), testowano również inne lipazy dostępne w handlu, ale w każdym z przypadków uzyskano niższe wydajności. Uwzględniono także wpływ ilości dodanego utleniacza (UHP – kompleks nadtlenu wodoru z mocznikiem) na szybkość reakcji. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na dobranie warunków reakcji w których następowała 99%-owa konwersja substratu już po 3 dniach procesu (Rysunek 1A).

Ważnym aspektem prowadzonych badań była ocena możliwości zastosowania DES-ów jako alternatywnych rozpuszczalników w procesie utleniania (Rysunek 1B). Reakcje przeprowadzono w DES-ach na bazie chlorku choliny i mocznika, glicerolu, glukozy i fruktozy z 10, 30 lub 50%-owym dodatkiem wody. Początkowo w reakcjach chemoenzymatycznego utleniania dodawano UHP jako utleniacz, a jako prekursor peroksy kwasu stosowano kwas oktanowy. Niestety, nie zaobserwowano żadnej konwersji, nawet po 10 dniach prowadzenia procesu. Zbadano zatem możliwość zastosowania tzw. minimalnego DES (mDES), w którym utleniacz jest również składnikiem mieszaniny eutektycznej. Jako czynnik utleniający w zaplanowanych eksperymentach zastosowano UHP oraz 30% roztwór nadtlenku wodoru. Konwersja substratów silnie zależała od rodzaju donora wiązań wodorowych zastosowanego jako składnik DES. Najbardziej efektywny okazał się rozpuszczalnik złożony z chlorku choliny i UHP. Już po 3 dniach trwania procesu konwersja benzylocyklopentanonu (**5**) wynosiła 92%, a ketonu z podstawnikiem *p*-izopropylbenzylowym (**1**) i *p*-metylobenzylowym (**3**) 99%. Gdy stosowano DES-y zawierające nadtlenek wodoru, reakcja przebiegała najefektywniej w mieszaninie chlorku choliny i mocznika z 10% dodatkiem H₂O₂. W tym przypadku konwersja po 3 dniach procesu wyniosła 98% dla ketonu **1**, 95% dla ketonu **3** i 91% dla ketonu **5**. Dobre wydajności, przekraczające 70% po 3 dniach, uzyskano również prowadząc reakcję w DES złożonych z chlorku choliny i glukozy z 30%-owym dodatkiem nadtlenku wodoru oraz z chlorku choliny i fruktozy z 30%-owym dodatkiem nadtlenku wodoru. Najniższą konwersję, która nie przekraczała 10% po 6 dniach, zaobserwowano w przypadku zastosowania mieszaniny chlorku choliny i glicerolu z 10%-owym dodatkiem nadtlenku wodoru. Warto podkreślić, że dla badanych α -benzylocyklopentanonów konwersja uzyskana w reakcjach prowadzonych w DES-ach była porównywalna z konwersją obserwowaną w octanie etylu oraz konwersją uzyskaną przez Wanga i in. dla niepodstawionego cyklopentanonu⁵⁴. Dodatkowo, w wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano nowe laktony: z podstawnikami *p*-metylobenzylowym (**4**) i *p*-izopropylbenzylowym (**2**), które scharakteryzowano na podstawie danych spektroskopowych. Podsumowując, przedstawiono pierwszą udaną próbę chemoenzymatycznego utleniania typu Baeyera-Villigera α -benzylocyklopentanonów w rozpuszczalnikach głęboko eutektycznych.

W **pracy P-2** wykorzystano enzymatyczny rozdział kinetyczny, w wyniku którego możliwy był otrzymanie pojedynczych enancjomerów 1-(cykloheks-1-en-1-yl)etanolu **8** (Rysunek 2). Reakcja ta była jednym z pierwszych przekształceń na szlaku pięcioetapowej syntezy, której celem było otrzymanie enancjomerów nowych, biologicznie aktywnych δ -halo- γ -laktonów. Pierwszym etapem procesu była redukcja 1-acetylocykloheksenu (**7**) do alkoholu allilowego **8**. Enancjomery tego alkoholu rozdzielono w reakcji enzymatycznej transestryfikacji, przeprowadzonej w eterze diizopropylowym, biokatalizatorem procesu była lipaza CAL-B, natomiast jako donor grupy acylowej, zastosowano propionian winylu. Dobór warunków reakcji opierał się głównie na wcześniejszych badaniach, prowadzonych dla alkoholi allilowych z układem 4-arylobut-3-en-2-olu⁵⁵, i pozwolił na efektywny rozdział już po 2h prowadzenia procesu w temperaturze pokojowej. W rezultacie otrzymano mieszaninę (*S*)-alkoholu (**8a**) i (*R*)-enancjomeru propionianu (**9**), którą rozdzielono metodami chromatograficznymi. Ester **9** następnie zhydrolizowano w środowisku zasadowym w celu otrzymania drugiego enancjomeru alkoholu. Konfiguracja centrów asymetrii uzyskanych izomerów alkoholi została potwierdzona przez porównanie ich znaków skręcalności właściwej z danymi literaturowymi^{56,57}. Przeprowadzona reakcja enzymatyczna zachodziła zgodnie z regułą Kazlauskasa, która zakłada enancjopreferencję większości lipaz do transestryfikacji (*R*)-enancjomeru alkoholu, jeśli substrat

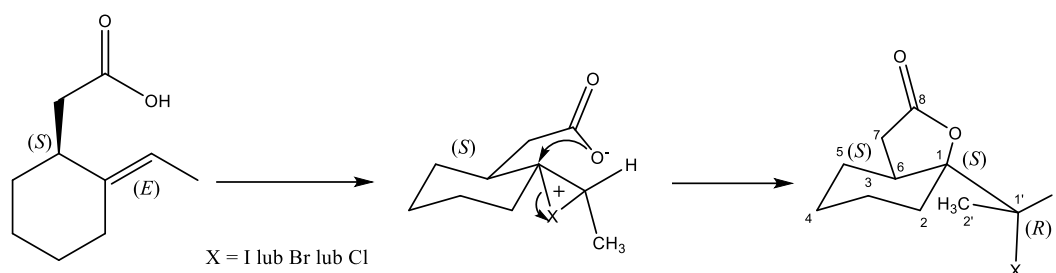
charakteryzuje się dużą różnicą wielkości podstawników przy atomie węgla z grupą hydroksylową⁵⁸. W kolejnym etapie alkohole poddano przegrupowaniu Johnsona-Claisena, które zapewnia przeniesienie chiralności na cząsteczkę estru. Dzięki analizie mechanizmu tego przegrupowania możliwe było przypisanie konfiguracji centrów stereogenicznych otrzymanych estrów. Z (*E,S*)-alkoholu **8a** powstał odpowiedni (*E,S*)-ester **10a**, natomiast z (*E,R*)-alkoholu **8b** otrzymano (*E,R*)-ester **10b** (Rysunek 2).



Rysunek 2 Chemoenzymatyczna synteza enancjomerów δ -chlorowco- γ -laktonów z 1-acetylocykloheksenu.

Następnie estry zhydrolizowano, w etanolowych roztworach NaOH, w wyniku czego otrzymano enancjomery odpowiednich kwasów karboksylowych **10a** i **10b**, które następnie stosowano jako substraty w trzech różnych rodzajach laktonizacji. Reakcje te umożliwiły wprowadzenie atomu jodu, bromu oraz chloru z jednoczesnym utworzeniem pierścienia laktonowego. Reakcję jodolaktonizacji prowadzono w środowisku zasadowym, stosując mieszaninę jodu w jodku potasu. Reakcję bromo- oraz chlorolaktonizacji prowadzono przy zastosowaniu odpowiednio *N*-bromoimidu kwasu bursztynowego lub *N*-chloroimidu kwasu bursztynowego. Cyklizacja kwasów wygenerowała dwa dodatkowe centra stereogeniczne w cząsteczkach powstałych chlorowcolaktonów. Mechanizm przedstawionych reakcji zakłada tworzenie odpowiednich kationów haloniowych w wyniku elektrofilowego ataku chlorowca na wiązanie C=C w cząsteczce nienasyconego kwasu. Nietrwały kation haloniowy reaguje z nukleofilowym atomem tlenu jonu karboksylanowego co umożliwia zamknięcie pierścienia laktonowego. Proces ten jest wysoce stereospecyficzny, a atak nukleofila przebiega z przeciwnej strony do utworzonego jonu haloniowego (Rysunek 3). Konsekwencją steryczną jest antyperiplanarna orientacja wiązań C-X i C-O^{59,60}, która determinuje konfiguracje dwóch nowych

centrów asymetrii. Zatem z enancjomeru (*S*)-kwasu **11a** otrzymano laktony o konfiguracji (*1S,6S,1'R*) (**12a, 13a, 14a**), a z (*R*)-enancjomeru kwasu **11b** otrzymano laktony o konfiguracji (*1R,6R,1'S*) (**12b,13b, 14b**).



Rysunek 3 Mechanizm reakcji halolaktonizacji.

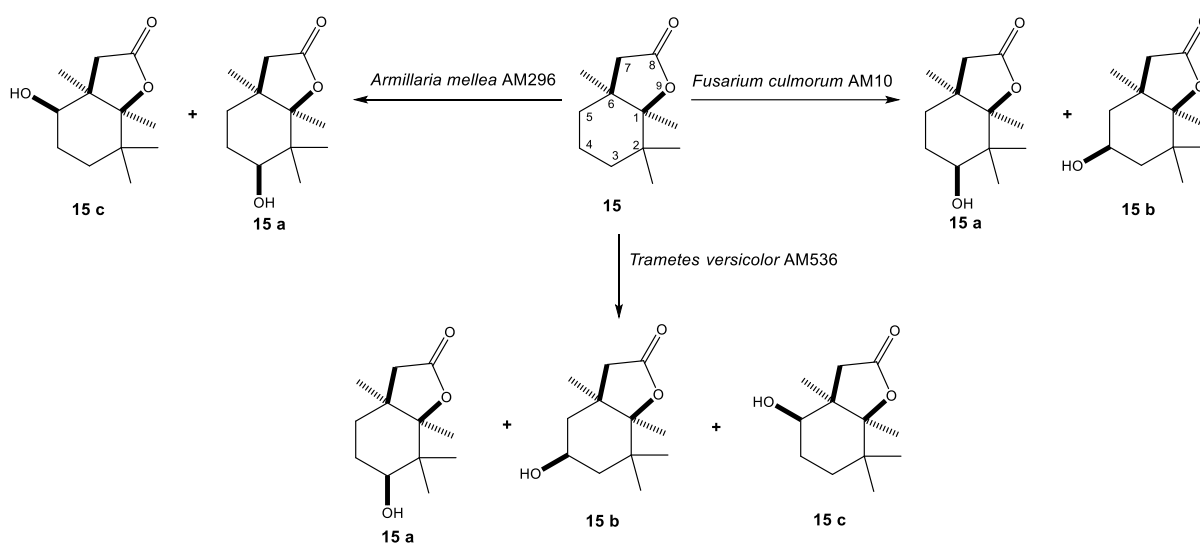
Uzyskane laktony poddano testom na aktywność antyproliferacyjną, określono ich potencjał przeciwbakteryjny oraz badano interakcje z błonami biologicznymi. Badania aktywności antyproliferacyjnej wykonano w Katedrze Biochemii, Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w zespole prof. Bożeny Obmińskiej-Mrukowicz. Badania interakcji związków laktonowych z błonami biologicznymi oraz cytotoksyczność względem erytrocytów badano w Katedrze Fizyki i Biofizyki UP we Wrocławiu, w zespole prof. Hanny Pruchnik. Natomiast badania aktywności przeciwbakteryjnej zostały wykonane we współpracy z profesorem Fouadem Bahri z Uniwersytetu Abd El Hamid Ibn Badiss w Mostaganem w Algierii. Wszystkie związki wykazywały znaczącą aktywność antyproliferacyjną, wobec testowanych linii komórkowych białaczki GL-1 oraz CLB70. Najbardziej aktywny okazał się enancjomer chlorolaktonu **14b**, zarówno względem linii GL-1 (IC_{50} 18,43 $\mu\text{g/mL}$), jak i CLB70 (IC_{50} 11,40 $\mu\text{g/mL}$). Wartość IC_{50} uzyskana w testach na linii CLB70 była zbliżona do wartości uzyskanej dla etopozydu (IC_{50} 14,31 $\mu\text{g/mL}$), stanowiącego kontrolę pozytywną. Nie zaobserwowano znaczącego wpływu rodzaju atomu chlorowca oraz konfiguracji centrów chiralności na ten rodzaj aktywności. Co istotne, badane związki nie powodowały hemolizy erytrocytów w teście cytotoksyczności. Badania oddziaływania laktonów z błonami krwinek czerwonych wykazały, że powodują one słabe zmiany w obszarze hydrofilowym dwuwarstwy lipidowej, natomiast nie zaobserwowano wpływu na płynność w obszarze hydrofobowym. Przedstawione wyniki sugerują, że badane laktony co prawda mają tendencję do słabego wiązania się z błoną, ale nie jest to bezpośrednio powiązane ze zwiększeniem jej przepuszczalności. Testowano również aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybową racemicznych laktonów. Stwierdzono, że niezależnie od rodzaju atomu chlorowca obecnego w cząsteczce, wykazują one selektywną aktywność wobec bakterii, w szczególności wobec szczepu *Proteus mirabilis* ATCC 35659, który może powodować m. in. infekcje układu moczowego.

Grzyby strzępkowe jako efektywne biokatalizatory służące do otrzymywania nowych związków z ugrupowaniem laktonowym.

Grzyby strzępkowe dzięki swoim wszechstronnym zdolnościom metabolicznym są jednym z głównych organizmów odpowiedzialnych za rozkład materii we wszystkich ekosystemach lądowych i w związku z tym odgrywają kluczową rolę w globalnym obiegu węgla i recyklingu składników odżywczych⁶¹. Biorąc pod uwagę ten potencjał metaboliczny stanowią one niezwykle efektywne

biokatalizatory w reakcjach z ksenobiotycznymi substratami, a katalizowane przez nie procesy obejmują m.in. hydroksylację oraz inne rodzaje utlenienia, reakcje sulfoksydacji i dealkilacji⁶². Jednak na szczególną uwagę zasługują procesy chemo-, regio- i stereoselektywne, w tym te, które prowadzą do otrzymywania związków optycznie czynnych, zwykle trudnych do uzyskania za pomocą tradycyjnej syntezy chemicznej. W przypadku stereoselektywnego wprowadzania grupy hydroksylowej w nieaktywowaną pozycję substratu, zastosowanie całych komórek mikroorganizmów ma istotne znaczenie. W procesach tych mogą brać udział enzymy katalizujące reakcje utlenienia m.in. enzymy cytochromu P450, wymagające zastosowania drogich kofaktorów NAD(P)H. Natomiast stosując całe komórki grzybów strzępkowych niezbędne kofaktory produkowane są, w procesach metabolicznych, bezpośrednio przez biokatalizator.

Z uwagi na przedstawione powyżej korzyści zastosowania grzybów strzępkowych w procesach funkcjonalizacji ksenobiotycznych substratów, to właśnie w obrębie tej grupy organizmów przeprowadzono badania wstępne mające na celu wyselekcjonowanie efektywnych biokatalizatorów w procesach, w których substraty stanowiły związki z ugrupowaniem laktonowym. W eksperymentach, które opisano w **pracy P-1**, spośród testowanych piętnastu szczepów grzybów strzępkowych wybrano trzy: *Fusarium culmorum* AM10, *Armillaria mellea* AM296 oraz *Trametes versicolor* AM536, które zdolne były do selektywnej hydroksylacji substratu (1,2,2,4-tetrametylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu) **15** (Rysunek 4).



Rysunek 4 Mikrobiologiczne przekształcenia 1,2,2,4-tetrametylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu w wyselekcjonowanych kulturach grzybów strzępkowych.

Biokatalizatorem, który najszybciej transformował substrat był szczep *Armillaria mellea* AM296 w przypadku, którego po 7 dniach trwania procesu, zaobserwowano całkowitą konwersję laktonu **15**. Proces transformacji prowadzony w kulturze *Trametes versicolor* AM536 trwał 14 dni a mieszaninie produktów obserwowano jeszcze niewielką ilość substratu (2%). Tylko jeden z biokatalizatorów (*Trametes versicolor* AM536) był zdolny do funkcjonalizacji substratu przy każdym z drugorzędowych atomów węgla pierścienia cykloheksanu. Szczep *Fusarium culmorum* AM10 prowadził hydroksylację substratu przy atomach węgla C-3 oraz C-4, natomiast produktami otrzymanymi w kulturze szczepu *Armillaria mellea* AM296 były laktony z grupą hydroksylową przy

atomie węgla C-3 oraz C-5. Dodatkowo na podstawie analizy danych spektroskopowych możliwe było określenie orientacji przestrzennej wprowadzonych grup hydroksylowych. W przypadku funkcjonalizacji przy atomie węgla C-3 oraz C-5 mała wartość stałych sprzężenia oraz kształt sygnałów protonów przy atomie węgla C-3 hydroksylaktonu **15a** oraz C-5 hydroksylaktonu **15c** sugerują, że grupy hydroksylowe przyjmują orientację aksjalną. Natomiast wyższa wartość stałej sprzężenia ($J=13$ Hz), obecna w tryplecie pochodzącym od jednego z protonów CH₂-5 hydroksylaktonu **15b** oraz kształt multipletu przy 3,87 ppm, sugerują aksjalną orientację protonu H-4 i w konsekwencji ekwatorialne położenie grupy hydroksylowej. W zależności od zastosowanego biokatalizatora, procesy biotransformacji prowadzone były z różną enancjoselektywnością. Produkt, w którym grupa hydroksylowa wprowadzona została przy atomie węgla C-3 (**15a**), otrzymano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, które wynosiły 99% dla produktu otrzymanego w kulturze *Armillaria mellea* AM296 oraz 92% dla hydroksylaktonu otrzymanego w kulturze *Fusarium culmorum* AM10. Produkt hydroksylacji w pozycji C-5 (**15c**), został wydzielony w postaci enancjomerycznie wzbogaconej, zarówno przy zastosowaniu szczepu *Armillaria mellea* AM296 (ee=65%) jak i *Trametes versicolor* AM536 (ee=17%).

Określono również aktywność antyproliferacyjną otrzymanych produktów biotransformacji względem dwóch linii nowotworowych psiej białaczki: GL-1 i CLB-70. Wszystkie testowane związki wykazywały zbliżoną aktywność antyproliferacyjną, tylko niewiele niższą od stosowanego jako kontrola etopozydu. W testach prowadzonych na linii komórkowej CLB-70 w przypadku hydroksylaktonu **15a** wartość IC₅₀ wynosiła 33,21 µg/mL, dla hydroksylaktonu **15b** 32,43 µg/mL, dla hydroksylaktonu **15c** 33,97 µg/mL natomiast dla etopozydu wartość IC₅₀ wynosiła 14,31 µg/mL.

Reasumując, istotnym elementem tej części badań było otrzymanie nieopisanych wcześniej w literaturze pochodnych z ugrupowaniem laktonowym, które uzyskano w formie czystych enancjomerów lub enancjomerycznie wzbogaconej. Funkcjonalizacja substratu następowała przy nieaktywowanych metylenowych atomach węgla, co było by trudne do osiągnięcia metodami tradycyjnej syntezy chemicznej. Dodatkowo hydroksylaktony wykazywały znaczącą aktywność antyproliferacyjną względem testowanych linii komórek nowotworowych.

Związki zawierające w swojej strukturze atom chlorowca mogą być przekształcane na różnych szlakach metabolicznych, natomiast często jednym z pierwszych i kluczowych przekształceń jest ich dehalogenacja. W zależności od warunków środowiskowych i rodzaju zastosowanego mikroorganizmu, mogą zachodzić różne procesy dehalogenacji, na przykład dehalogenacja redukcyjna, dehydrohalogenacja czy dehalogenacja hydrolityczna⁶³⁻⁶⁵. We wszystkich tych procesach atom chlorowca jest usuwany z cząsteczki substratu. Redukcyjna dehalogenacja prowadzi do zastąpienia atomu chlorowca przez atom wodoru, dehydrohalogenacja prowadzi do eliminacji cząsteczki chlorowodoru i otrzymania związku z wiązaniem podwójnym C=C, natomiast w procesie hydrolitycznej dehalogenacji atom chlorowca wymieniany jest na grupę hydroksylową. W pracy **P-6** opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, opisano mikrobiologiczne przekształcenia racemicznych chlorocolaktonów otrzymanych z 1-acetylocykloheksenu (**7**). Ścieżkę syntezy chlorocolaktonów, które były substratami w tych procesach opisano wcześniej dla ich poszczególnych enancjomerów (**P-2**). Spośród ośmiu testowanych na etapie selekcji szczepów grzybów strzępkowych, wybrano tylko jeden *Absidia glauca* AM177, który zdolny był do efektywnej transformacji jodo-, bromo- oraz chlorolaktonu (**12**, **13**, **14**). We wszystkich prowadzonych biotransformacjach otrzymano produkt hydrolitycznej dehalogenacji substratów (**16**) (Rysunek 5).



Rysunek 5 Mikrobiologiczne przekształcenia racemicznych chlorowcolaktonów **12**, **13**, **14** w kulturze szczepu *Absidia glauca* AM177.

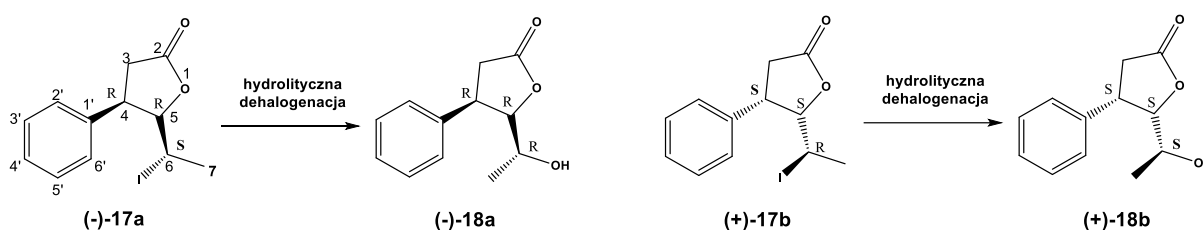
W tym wypadku proces biotransformacji wykazywał małą stereoselektywność. Otrzymane produkty charakteryzowały się nieznacznymi nadmiarami enancjomerycznymi (+)-hydroksylaktonu **16**. Najwyższy nadmiar enancjomeryczny (ee=16%) uzyskany został w trakcie biotransformacji chlorolaktonu **14**. Substraty i produkt były przedmiotem testów na aktywność antyproliferacyjną. Prowadzono je na szeregu linii komórkowych, w tym linii komórek prawidłowych NIH/3T3 (fibroblasty mysie) oraz linii komórek nowotworowych CLBL-1 (chłoniak B-komórkowy), CNK-89 (chłoniak komórek NK), CL-1 (chłoniak T-komórkowy) oraz Jurkat (linia białaczki T komórkowej człowieka). Testowane związki nie wykazywały cytotoksyczności względem komórek prawidłowych, natomiast można było zaobserwować selektywną aktywność antyproliferacyjną względem testowanych linii komórek nowotworowych. W przypadku otrzymanego produktu biotransformacji **16** wartość IC_{50} wyznaczona w teście na linii CL-1 wynosiła 78,55 $\mu\text{g/mL}$, natomiast najwyższą aktywność względem tej linii wykazywał chlorowcolakton **14** (IC_{50} 37,06 $\mu\text{g/mL}$). Jako jedyny z testowanych związków wykazywał on również aktywność względem linii Jurkat (IC_{50} 85,9 $\mu\text{g/mL}$). Z kolei jedynie jodolakton **12** hamował proliferację komórek linii CNK-89 (IC_{50} 93,39 $\mu\text{g/mL}$).

β -arylo- γ -laktony wykazują znaczną aktywność antyproliferacyjną wobec wielu linii komórek nowotworowych, zarówno ludzkich takich jak białaczka T-komórkowa (Jurkat), jak i psich nowotworów układu chłonnego np. ostrej białaczki B-komórkowej (GL-1), chłoniaka B-komórkowego (CLBL-1) lub nowotworów układu krwiotwórczego - kostniakomięsaka (D17)^{60,66,67}. Stwierdzono, że β -arylo- γ -laktony zawierające w swojej strukturze dodatkowo atom jodu, indukują apoptozę komórek nowotworowych na szlaku mitochondrialnym, poprzez obniżenie ekspresji białek antyapoptotycznych Bcl-xL i Bcl-2^{68,69}. Natomiast aktywność pochodnych, które powstają na drodze mikrobiologicznych przekształceń tych związków nie jest jeszcze dokładnie poznana.

Stanowiło to inspirację dla tematu podjętego w kolejnej pracy (**P-3**), która dotyczyła metabolizmu γ -jodolaktonu z podstawnikiem β -fenylowym (*rac*-**17**) w kulturach grzybów strzępkowych oraz określenia aktywności antyproliferacyjnej zarówno jego pojedynczych enancjomerów jak i produktów biotransformacji. Konfiguracje centrów stereogenicznych obu enancjomerów jodolaktonu zostały wyznaczone we wcześniejszych badaniach, na podstawie danych krystalograficznych⁷⁰, co pozwoliło na zaproponowanie konfiguracji centrów stereogenicznych produktów biotransformacji. Wstępna selekcja biokatalizatorów, do przeprowadzenia efektywnego przekształcania jodolaktonu (*rac*-**17**), pozwoliła wyłonić szczepy *Absidia cylindrospora* AM336, *Absidia glauca* AM254 oraz *Fusarium culmorum* AM10, wykazujące zdolność do efektywnego przekształcania jodolaktonu (*rac*-**17**). We wszystkich procesach jako jedyny produkt otrzymywano *cis*-5-(1-hydroksyetylo)-4-fenylohidrofurany-2-on (*rac*-**18**), który wydzielono z wysoką 38%-ową wydajnością izolowaną. We wcześniejszych badaniach, *trans*-diastereoizomer hydroksyloaktonu, otrzymano na

drodze chemicznej laktonizacji nienasyconego estru z udziałem kwasu *m*-chloroperoksybenzoesowego, niestety ze stosunkowo niską wydajności izolowaną, wynoszącą jedynie 9%⁷¹.

Eksperymenty z wykorzystaniem pojedynczych enancjomerów jodolaktonu pozwoliły na analizę stereoselektywności procesu, a także przewidywanie konfiguracji centrów chiralności produktów. Procesy biotransformacji enancjomerów były wysoce stereoselektywne i otrzymano praktycznie czyste optycznie hydroksylaktony (ee≥99%). Niezależnie od zastosowanego biokatalizatora, z pojedynczego enancjomeru substratu powstawał pojedynczy enancjomer produktu (Rysunek 6).



Rysunek 6. Mikrobiologiczna przekształcenia enancjomerów *cis*-5-(1-jodoetylo)-4-fenyldihydrofuran-2-onu **17a** i **17b** oraz przewidywana konfiguracja centrów stereogenicznych produktów hydrolytycznej dehalogenacji.

Przedstawiony w licznych badaniach mechanizm mikrobiologicznej hydrolytycznej dehalogenacji prowadzi do inwersji konfiguracji na atomie węgla związanym z atomem chlorowca^{65,72,73}. Powodem tego są czynniki steryczne, które powodują zbliżanie się czynnika nukleofilowego, którym może być cząsteczka wody, od strony przeciwnej do wiązania węgiel-chlorowec. Reakcja mikrobiologicznej hydrolytycznej dehalogenacji z dużym prawdopodobieństwem przebiega analogicznie do chemicznej substytucji nukleofilowej typu S_N2, co prowadzi do inwersji konfiguracji na atomie węgla C-6. Z tego powodu z (-)-(4*R*,5*R*,6*S*)-jodolaktonu **17a** powstał (-)-(4*R*,5*R*,6*R*)-hydroksylakton **18a**, a z (+)-(4*S*,5*S*,6*R*)-jodolaktonu **17b** - (+)-(4*S*,5*S*,6*S*)-hydroksylakton **18b**. Wszystkie trzy badane szczepy wykazywały zdolność do transformacji obu enancjomerów tego związku. Mimo, że szybkość transformacji jodolaktonów **17a** i **17b** była nieco inna we wszystkich doświadczeniach, można zaobserwować, że na początku procesu enancjomer (-)-**17a** jodolaktonu jest przekształcany efektywniej w porównaniu z enancjomerem (+)-**17b**. Jest to szczególnie widoczne w kulturach szczepów *Absidia cylindrospora* AM336 i *Absidia glauca* AM254.

Dysponując czystymi optycznie jodolaktonami oraz otrzymanymi na drodze biotransformacji enancjomerami hydroksylaktonu możliwe było określenie aktywności antyproliferacyjnej tych związków, co pozwoliło na porównanie wpływu obecności atomu jodu oraz grupy hydroksylowej na ich aktywność. Ocena aktywności antyproliferacyjnej prowadzona była dla dwóch linii komórkowych chłoniaka (CLBL-1 oraz CNK-89) oraz linii białaczki (CLB70). W przypadku testowanych związków, konfiguracja centrów stereogenicznych poszczególnych enancjomerów, nie miała znaczącego wpływu na aktywność. Natomiast decydująca okazała się obecność atomu jodu lub grupy hydroksylowej. Najwyższą cytotoxycznosc testowane związki wykazywały względem linii chłoniaka B-komórkowego (CLBL-1). Najniższa wartość IC₅₀, wynosząca 30,19 µg/mL, została wyznaczona dla prawoskrętnego enancjomeru jodolaktonu **17b**. Natomiast wartości IC₅₀ wyznaczone dla enancjomerów hydroksylaktonów były zdecydowanie wyższe (80,17 µg/mL dla **18a** oraz 71,69 µg/mL

dla **18b**). Hydroksylaktony nie wykazywały aktywności antyproliferacyjnej względem pozostałych testowanych linii komórkowych. Natomiast, zarówno w przypadku linii CLB70 jak i CNK-89, jodolakton **17b** wykazywał nieznacznie wyższą aktywność niż jego enancjomer **17a**.

Podsumowując, istotnym elementem tej części badań było wyznaczenie stereoselektywności procesu hydrolitycznej dehalogenacji enancjomerów jodolaktonu, co pozwoliło na przewidywanie konfiguracji na atomach węgla połączonych z grupą hydroksylową w cząsteczkach produktów.

Podsumowanie wyników osiągnięcia naukowego:

Najważniejsze i najbardziej interesujące rezultaty zawarte w przedstawionym przeze mnie do oceny cyklu prac to:

1. Otrzymanie 11 optycznie czynnych i 7 racemicznych związków z ugrupowaniem laktonowym nieopisanych dotąd w literaturze. Struktury otrzymanych związków zostały w pełni scharakteryzowane na podstawie danych spektroskopowych, w tym widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, oraz widm dwuwymiarowych HSQC, HMBC, COSY jak również analizy widm w podczerwieni (IR) oraz widm masowych (MS i HRMS). Dla większości optycznie czynnych izomerów określono konfiguracje absolutne ich centrów stereogenicznych.
2. Opracowanie warunków efektywnego utlenienia typu Baeyera-Villigera α -benzylocyklopentanonów w różnych rozpuszczalnikach estrowych oraz przeprowadzenie pierwszej udanej próby chemoenzymatycznego utleniania Baeyera-Villigera α -benzylocyklopentanonów w rozpuszczalnikach gędko eutektycznych.
3. Opracowanie procesu chemoenzymatycznej syntezy enancjomerów bicyklicznych chlorocolaktonów (**12a,b**, **13a,b**, **14a,b**) oraz określenie konfiguracji centrów chiralności dla otrzymanych połączeń, na bazie danych literaturowych i stereospecyficznego przebiegu poszczególnych etapów syntezy. Dodatkowo wyniki aktywności antyproliferacyjnej enancjomerów chlorocolaktonów wykonane dla linii komórek nowotworowych ostrej białaczki B-komórkowej (GL-1) oraz przewlekłej białaczki B-komórkowej (CLB 70), wykazały znaczną aktywność testowanych laktonów, porównywalną do zastosowanego jako kontrola etopozydu. Testowane związki nie powodowały hemolizy erytrocytów i nie wpływały znacząco na płynność dwuwarstwy lipidowej.
4. Określenie pierwszego etapu metabolizmu szeregu związków laktonowych w wyselekcjonowanych kulturach grzybów strzępkowych. Procesy te prowadziły do otrzymania hydroksylowych pochodnych substratów w procesach stereoselektywnego utlenienia bądź hydrolitycznej dehalogenacji.
5. Otrzymanie czystych optycznie oraz enancjomerycznie wzbogaconych hydroksylaktonów (**15a**, **15b**, **15c**) w procesie mikrobiologicznej funkcjonalizacji 1,2,2,4-tetrametylo-9-oksabicyklo[4.3.0]nonan-8-onu **15**, które wykazywały znaczną aktywność antyproliferacyjną w testach wykonanych na linii komórek nowotworowych ostrej białaczki B-komórkowej (GL-1) oraz przewlekłej białaczki B-komórkowej (CLB 70).
6. Wyznaczenie stereoselektywności procesu hydrolitycznej dehalogenacji enancjomerów *cis*-5-(1-jodoetylo)-4-fenylodihydrofuran-2-onu (**17a** i **17b**), co pozwoliło na przewidywanie konfiguracji na atomach węgla połączonych z grupą hydroksylową w cząsteczkach produktów (**18a** i **18b**).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Staż naukowy realizowany na Uniwersytecie w Zagrzebiu w Laboratorium Technologii Komórki, Zastosowań i Biotransformacji

W roku 2014 nawiązałam współpracę z grupą badawczą kierowaną przez Prof. Višnje Gaurine Srček. Efektem czego był mój trzymiesięczny staż naukowy na Uniwersytecie w Zagrzebiu w Laboratorium Technologii Komórki, Zastosowań i Biotransformacji, którego kierownikiem jest profesor Višnja Gaurina Srček. Stypendium stażowe finansowane było w ramach projektu „Ustawiczne all inclusive” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej (Zał. 3., II, 14.2.1.). Jednostka, w której odbywałam staż jest znana z osiągnięć związanych z wprowadzaniem zielonych rozpuszczalników jako medium w procesach biotransformacji czy ekstrakcji ale też badań nad wpływem tych rozpuszczalników na środowisko. W trakcie pobytu na stażu realizowałam dwa zadania badawcze. Pierwsze dotyczyło biokatalizy w cieczach głęboko eutektycznych (DES). Drugie polegało na określeniu aktywności cytotoksycznej związków z ugrupowaniem laktonowym na wybranych komórkach linii nowotworowych.

W pierwszym zadaniu jako substrat w procesie bioredukcji został zastosowany prochiralny ester etylowy kwasu 3-oksobutanowego z uwagi na to, że produkty reakcji w zależności od konfiguracji nowego centrum chiralności mogą być wykorzystane jako chiralne reagenty w procesach otrzymywania farmaceutyków, aromatów lub substancji zapachowych. Hydroksyester o konfiguracji *S* może być stosowany jako kluczowy chiralny półprodukt do syntezy lavandulolu i sulkatolu⁷⁴, natomiast enancjomer *R* jest uniwersalnym półproduktem w syntezie antybiotyków⁷⁵. Jako biokatalizator tego procesu zostały zastosowane drożdże piekarskie, *Saccharomyces cerevisiae*, z uwagi na niski koszt otrzymywania i powszechną dostępność. Są one także niepatogenne (posiadają status GRAS) i łatwe w hodowli nawet w niesterylnym środowisku. Mikroorganizm ten posiada wysoką aktywność katalityczną jako biokatalizator reakcji redoks i jest szczególnie chętnie wykorzystywany do enancjoselektywnej redukcji grupy karbonylowej, co wiąże się z wprowadzeniem nowego centrum stereogenicznego⁷⁶. W przypadku zastosowania całych komórek mikroorganizmu nie jest też konieczne dodawanie stechiometrycznych ilości drogich kofaktorów lub opracowanie systemu ich regeneracji, co znacznie ułatwia cały proces ale też istotnie obniża jego koszty.

Kluczowym aspektem procesu było zastosowanie zielonych rozpuszczalników w postaci cieczy głęboko eutektycznych. DES-y są jedną z najmłodszych klas wśród tzw. przyjaznych dla środowiska rozpuszczalników, ale ich właściwości, takie jak nietłotność, niepalność i stabilność, w połączeniu z łatwą biodegradacją, dzięki naturalnym składnikom używanym do ich otrzymania, czynią je niemal idealnymi rozpuszczalnikami do syntez organicznych. Rozpuszczalniki te są również proste w przygotowaniu. W pracy zastosowano DES-y na bazie chlorku choliny oraz różnych donorów wiązań wodorowych (HBD) i oceniono możliwości ich zastosowania jako medium w reakcji enancjoselektywnej redukcji. Skład rozpuszczalników, a w szczególności typ donora wiązań wodorowych oraz ilość wody obecnej w DES-ach znacząco wpływały na wydajność reakcji. Przy zawartości wody 50% (w/w), w DES-ach zawierających cukier lub alkohol jako HBD, otrzymano najwyższą wydajność redukcji, zbliżoną do uzyskanej w buforze fosforanowym (<93,0%). Natomiast w DES-ach opartych na kwasach lub moczniku

obserwowano słabe wydajności niezależnie od zawartości wody (<49,3%). Uzyskane wyniki sugerują, że wartość pH podłoża reakcyjnego, która jest związana z zastosowanym rodzajem donora wiązań wodorowych, może w znaczący sposób wpływać na żywotność komórek i ma znaczący wpływ na wydajność bioredukcji. Uzyskane wyniki sugerują, że DES-y zawierające cukier jako HBD, posiadają dobrą biokompatybilność z komórkami drożdży i mogą znaleźć zastosowanie jako zielone medium reakcyjne. Część badań, w którą byłam bezpośrednio zaangażowana dotyczyła określenia stereoselektywności procesu, ponieważ poprzez zmianę procentowego udziału wody, będącej składnikiem DES-u, możliwe było otrzymanie w przewodzie *S*- lub *R*-hydroksyestru. We wszystkich testowanych wariantach reakcji, przy niższej zawartości wody znacząco obniża się enancjoselektywność bioredukcji. W przypadku zastosowania DES-u złożonego z chlorku cholinylu i fruktozy, gdy medium reakcyjne zawierało tylko 10% wody w mieszaninie produktów dominował *R*-enancjomer hydroksyestru ($ee = 23\%$), natomiast zwiększenie ilości wody uprzywilejowało powstawanie *S*-hydroksyestru. W przypadku zastosowania 40% dodatku wody nadmiar enancjomeryczny *S*-hydroksyestru wynosił 43%, natomiast przy zastosowaniu 90% dodatku wody wynosił już 92% na korzyść *S*-enancjomeru hydroksyestru. Wyniki otrzymane w trakcie realizacji tej części badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Process Biochemistry* (Zał. 3., II, 4.1.2.5.).

Drugim tematem badawczym, który realizowałam na Uniwersytecie w Zagrzebiu było określenie właściwości cytotoksycznych chlorowcolaktonów zawierających atomy jodu, bromu lub chloru względem linii komórek nowotworowych. Dało mi to możliwość przeprowadzenia testów cytotoksyczności związków z ugrupowaniem laktonowym, ale również zapoznania się z metodami pracy stosowanymi przy hodowli komórek, w tym komórek nowotworowych. Do badań wybrano linię nowotworową HeLa i linię komórek prawidłowych CHO-K1, a cytotoksyczność określano przy zastosowaniu testu WST-1. Komórki hodowano w podłożu DME uzupełnionym 10% (v/v) FBS w inkubatorze z atmosferą nawilżoną i zawierającą 5% CO₂, w temperaturze 37°C. Komórki HeLa i CHO-K1 posiewano na płytki 96-dołkowe. Po 24 h inokulacji pożywkę zastępowano świeżą, zawierającą 0,1 i 0,2 mM badanych laktonów. Wyniki odczytywano po dodaniu odczynnika WST-1 przy 450 nm na czytniku mikroplatek Tecan. Doświadczenia wykonywano w trzech powtórzeniach, a otrzymane wyniki wyrażono jako procent żywych komórek w stosunku do kontroli. Przeprowadzone testy aktywności cytotoksycznej stanowiły część pracy, która ukazała się w czasopiśmie *PLoS ONE* (Zał. 3., II, 4.1.2.11.).

Staż naukowy realizowany w Instytucie Chemii IC2MP na Uniwersytecie w Poitiers we Francji

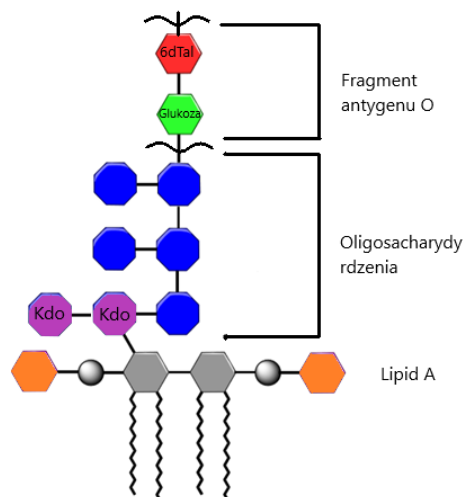
W 2015 roku nawiązałam współpracę z doktorem Charlesem Gauthier, pod opieką którego realizowałam staż naukowy, odbywający się w Instytucie Chemii IC2MP na Uniwersytecie w Poitiers we Francji. Stypendium stażowe zostało sfinansowane w ramach dotacji projakościowej KNOW (Zał. 3., II, 15.2.), a następnie z projektu, którego kierownikiem był dr Charles Gauthier (Zał. 3., II, 9.2.1.). Temat badawczy podjęty w trakcie realizacji stażu dotyczył chemii cukrów ze szczególnym uwzględnieniem procesów glikozylacji oraz otrzymywania pochodnych cukrowych będących elementem budulcowym lipopolisacharydu (LPS) bakterii *Burkholderia pseudomallei* i *Burkholderia mallei*. *B. pseudomallei* jest czynnikiem etiologicznym melioidozy. Jest to choroba występująca głównie na terenach tropikalnych i subtropikalnych Azji, Afryki, Ameryki Południowej oraz Australii, niezwykle niebezpieczna z powodu dużej odporności patogenu na antybiotyki oraz dużej śmiertelności chorych

(dochodzącej nawet do 50%)⁷⁷. Natomiast *B. mallei*, jest czynnikiem etiologicznym nosaczyny, choroby dotykającej przede wszystkim zwierząt nieparzystokopytnych, ale mogącej również prowadzić do śmiertelnych infekcji u ludzi⁷⁸.

W trakcie realizacji stażu podjęłam dwa zagadnienia badawcze. Pierwsze dotyczyło opracowania skutecznej metody otrzymywania β -glikozydów kwasu 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowego (Kdo), które są składnikami polisacharydów wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Burkholderia*. Drugie miało na celu syntezę chemiczną mono- i disacharydów wytwarzanych przez bakterie *B. pseudomallei* i *B. mallei*, które rozpoznawane są przez przeciwciała specyficzne względem tych patogenów i mogą posłużyć do opracowania metod diagnostycznych lub szczepionki.

Kwas 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowy stanowi wysoce konserwatywny i istotny element budowy lipopolisacharydów znajdujących się w zewnętrznej warstwie błony bakterii Gram-ujemnych (Rysunek 7). LPS, zwany również endotoksyną, jest jednym z czynników wpływających na patogenność bakterii Gram-ujemnych⁷⁹. Uwolniona podczas podziału lub lizy komórki bakteryjnej, endotoksyna wywołuje odpowiedź immunologiczną gospodarza i wydzielanie czynników prozapalnych. Co ciekawe, endotoksyna może również wywoływać pozytywne efekty poprzez stymulację odporności gospodarza na infekcje bakteryjne. Endotoksyny syntetyzowane przez różne gatunki bakterii mają wspólne elementy struktury składające się z polisacharydowego łańcucha O-swoistego (antygeny O), oligosacharydowego rdzenia i lipidu A^{80,81}.

Glikozydy Kdo o konfiguracji α są obecne praktycznie we wszystkich regionach rdzenia lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych, odgrywając kluczową rolę w strukturalnej integralności błon bakteryjnych⁸². Glikozydy β -Kdo występują znacznie rzadziej w obrębie LPS natomiast identyfikowane są w obrębie polisacharydów otoczki bakterii Gram-ujemnych (CPS) ściśle związanych ze ścianą komórkową, a w przypadku *B. pseudomallei* także jako element egzopolisacharydów (EPS) luźno związanych z powierzchnią mikroorganizmu⁸³.



Rysunek 7. Schemat budowy lipopolisacharydu *B. pseudomallei* i *B. mallei*.

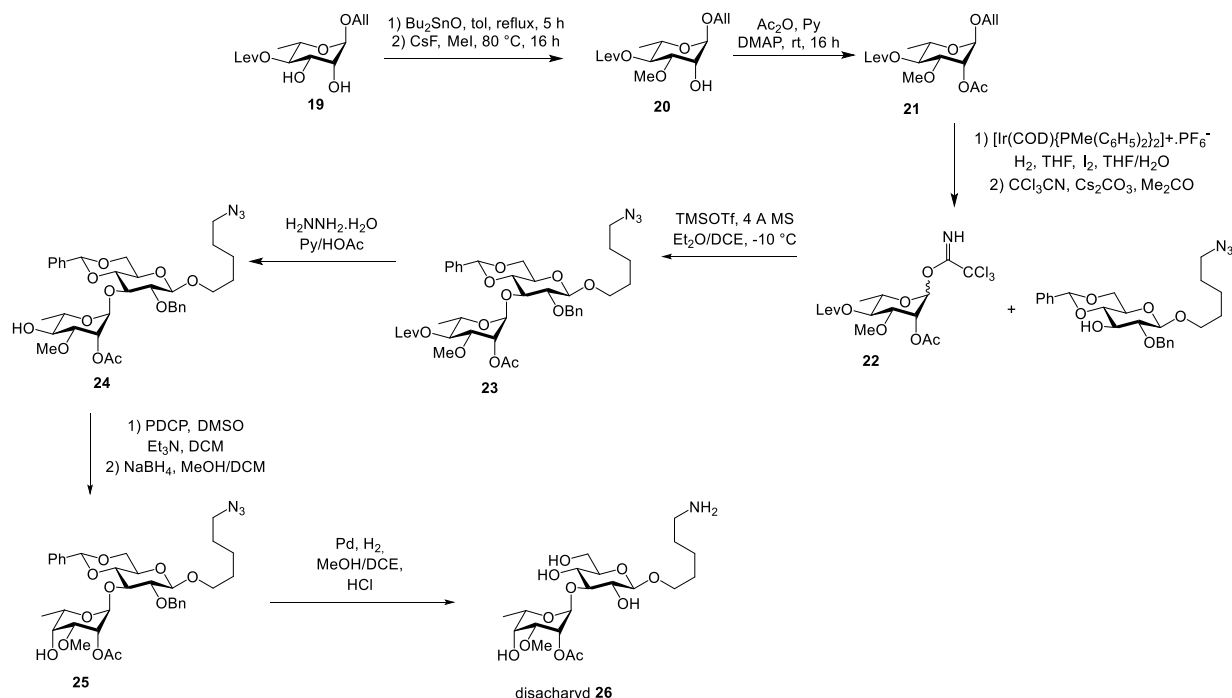
Mimo, że znane są metody otrzymywania α -glikozydów Kdo z bardzo dobrą wydajnością i stereoselektywnością, to otrzymywanie β -glikozydów tego kwasu jest zdecydowanie trudniejsze⁸⁴. Dlatego podjęto badania nad opracowaniem efektywnej metody otrzymywania właśnie tego typu

połączeń. Miedzy innymi sprawdzono wpływ rozpuszczalnika, inicjatorów reakcji oraz rodzaju podstawnika przy atomie węgla C-1 na wydajność otrzymywania β -glikozydów. W pierwszym etapie otrzymano fluoropochodne lub tioglikozydowe pochodne Kdo zawierające dodatkowo podstawniki benzyłowy i fenacyłowe, których obecność korzystnie wpływa na wydajność reakcji glikozylacji. Zastosowanie podstawnika 4'-metoksyfenacyłowego przy atomie węgla C-1 najefektywniej zwiększała stosunek anomeru β do α w mieszaninie produktów glikozylacji. Z szeregu testowanych rozpuszczalników, jako najbardziej korzystny, wybrano acetonitryl. Najlepszym inicjatorem reakcji okazało się połączenie NIS/AgOTf (N-jodosukcynoimid / trifluorometanosulfonian srebra). Po określeniu optymalnych warunków, końcowym etapem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania metody poprzez przeprowadzenie szeregu reakcji glikozylacji z udziałem alkoholi o różnej rzędowości. Jako alkohol pierwszorzędowy zastosowany został nonanol. Reakcję wykonano również z udziałem dwóch alkoholi drugorzędowych, cykloheksanolu oraz 2-adamantanolu. Dużym sukcesem okazała się udana próba glikozylacji, w której zastosowano 1-adamantanol jako alkohol trzeciorzędowy. Dzięki przeprowadzonym eksperymentom, opracowano nową metodę stereoselektywnego otrzymywania glikozydów β -Kdo, wykorzystując korzystny efekt jaki wykazywała obecność 4'-metoksyfenacyłowej grupy pomocniczej w pozycji C1 peracetylowanego tioglikozydu Kdo. Przeprowadzone eksperymenty opisano w pracy, która ukazała się w *Journal of Organic Chemistry* (Zał. 3., II, 4.1.2.8.).

Drugi istotny aspekt badań dotyczył otrzymywania mono i diglikozydowych pochodnych, które stanowiły analogi fragmentów łańcucha O-swoistego bakterii *B. pseudomallei* i *B. mallei*. Antygen O jest homo- lub heteropolimerem złożonym z powtarzających się oligosacharydowych podjednostek, z których każda zawiera do ośmiu reszt cukrowych. Dzięki unikatowej i charakterystycznej dla danego szczepu budowie, łańcuch O-swoisty odgrywa niezwykle ważną rolę, jako antygen powierzchniowy bakterii Gram-ujemnych. Struktura antygeny O bakterii *B. pseudomallei* i *B. mallei*, składa się z liniowego heteropolimeru zawierającego fragment złożony z 6-deoksy- α -L-talopiranozy i β -D-glukopiranozy, jako powtarzającą się podjednostkę. Różnice międzygatunkowe w obrębie antygeny O, polegają na odmiennym podstawieniu reszt 6-deoksytalozy, np. O-acetylacji oraz O-metylacji. Różnice w strukturze antygeny O wpływają na interakcję z przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) specyficznymi względem LPS. Stąd modyfikacje części cukrowej antygeny O mogą mieć wpływ na rozpoznawanie tych fragmentów przez przeciwciała i odpowiedź immunologiczną, a co za tym idzie mogą stanowić kluczowe elementy struktury, które należy wziąć pod uwagę przy opracowywaniu szczepionek opartych na LPS. Celem tej części badań było otrzymanie serii oligosacharydów stanowiącej epitopy obecne w fragmencie antygeny O bakterii *B. pseudomallei* i *B. mallei*.

Fragment badań, w których uczestniczyłam obejmował otrzymanie, na drodze wieloetapowej syntezy chemicznej, glikozydowych pochodnych talozy oraz glikozydowych pochodnych talo-glukopiranozydowych, które odpowiadają fragmentom antygeny O charakterystycznym dla *B. pseudomallei* i *B. mallei* oraz ich połączeń z biotyną. Przykładowy szlak syntezy jednego z disacharydów przedstawiono na Rysunku 8. Rozpoczął się on od allilowej pochodnych L-ramnozy **19**, którą poddano O-metylacji a następnie zabezpieczono grupę hydroksylową przy atomie węgla C-2 podstawnikiem acetylowym (**21**). W następnym kroku aktywowano otrzymane pochodne przez wprowadzenie podstawnika trichloroacetoimidioilowego (**22**) dzięki czemu możliwe było otrzymanie disacharydu **23** w reakcji z odpowiednim β -D-glukopiranozydem. W kolejnych etapach następowało

zdjęcie reszty kwasu lewulinowego (**24**), zabezpieczającą grupę hydroksylową przy atomie węgla C-4 ramnozy i konwersja reszty L-ramnozy do 6-deoksy-L-talozy (**25**). W wyniku hydrogenolizy otrzymano disacharydy **26** w postaci pochodnej amoniowej do której w kolejnym kroku przyłączono cząsteczkę biotyny.



Rysunek 8. Schemat syntezy disacharydu **26**.

Badania biologiczne otrzymanych połączeń prowadzone były przez zespoły specjalistów z Tajlandii (Prince of Songkla University, Mahidol University), Stanów Zjednoczonych (University of Nevada) oraz Włoch (Università di Napoli Federico II). Syntetyczne oligosacharydy zastosowano do wyznaczenia i scharakteryzowania minimalnych epitopów wiążących dla serii przeciwciał monoklonalnych specyficznych względem LPS bakterii *B. pseudomallei* i *B. mallei*, które stanowią bierny element ochrony immunologicznej w mysich modelach melioidozy i nosacizny. Myszy immunizowane konstruktami disacharyd-immunogenne białko nośnikowe (CRM197) wytwarzały wysokie miana przeciwciał, które reagowały krzyżowo z antygenem O, charakterystycznym dla *B. mallei*. Całość badań opublikowano w *Nature Communications* (Zał. 3., II, 4.1.2.10.) i mogą stanowić one podstawę w procesie opracowania testów diagnostycznych lub wyłonienia epitopów LPS, które mogą posłużyć w procesie opracowania szczepionki przeciwko chorobom wywoływanym przez *B. pseudomallei* i *B. mallei*.

Wykaz cytowanej literatury:

1. Bordignon A, Frédérich M, Ledoux A, et al. In vitro antiplasmodial and cytotoxic activities of sesquiterpene lactones from *Vernonia fimbrillifera* Less. (Asteraceae). *Nat Prod Res.* 2018;32(12):1463-1466. doi:10.1080/14786419.2017.1350665
2. Perveen S, Alqahtani J, Orfali R, et al. Antimicrobial guaianolide sesquiterpenoids from leaves of the Saudi Arabian plant *Anvillea garcinii*. *Fitoterapia.* 2019;134(February):129-134. doi:10.1016/j.fitote.2019.02.017
3. Kudumela RG, Mazimba O, Masoko P. Isolation and characterisation of sesquiterpene lactones from *Schkuhria pinnata* and their antibacterial and anti-inflammatory activities. *South African J Bot.* 2019;126:340-344. doi:10.1016/j.sajb.2019.04.002
4. Cuadrado-Silva CT, Castellanos L, Arévalo-Ferro C, Osorno OE. Detection of quorum sensing systems of bacteria isolated from fouled marine organisms. *Biochem Syst Ecol.* 2013;46:101-107. doi:10.1016/j.bse.2012.09.010
5. Adekenov SM. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. *Fitoterapia.* 2017;121(March):16-30. doi:10.1016/j.fitote.2017.05.017
6. Sartori SK, Diaz MAN, Diaz-Muñoz G. Lactones: Classification, synthesis, biological activities, and industrial applications. *Tetrahedron.* 2021;84:132001. doi:10.1016/j.tet.2021.132001
7. Wheland R, Bartlett PD. α -Lactones from diphenylketene and di-tert-butylketene. *J Am Chem Soc.* 1970;92(20):6057-6058. doi:10.1021/ja00723a042
8. Yang J, Yang Z, Yin Y, Rao M, Liang Y, Ge M. Three novel polyene macrolides isolated from cultures of *Streptomyces lavenduligriseus*. *J Antibiot (Tokyo).* 2016;69(1):62-65. doi:10.1038/ja.2015.76
9. Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4618. doi:10.3390/ijms21134618
10. Jastrzebska I. Synthesis and application of steroidal 22,16 β -carbolactones: A review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;199(January):105592. doi:10.1016/j.jsbmb.2020.105592
11. Matos MS, Anastácio JD, Dos Santos CN. Sesquiterpene lactones: Promising natural compounds to fight inflammation. *Pharmaceutics.* 2021;13(7):991. doi:10.3390/pharmaceutics13070991
12. Krzyczkowska J, Białecka-Florjańczyk E, Stolarzewicz I. Biotechnologiczne metody otrzymywania substancji zapachowych. *Zywn Nauk Technol Jakość.* 2009;16(3):5-18.
13. Zeng L, Zhou Y, Fu X, et al. Biosynthesis of Jasmine Lactone in Tea (*Camellia sinensis*) Leaves and Its Formation in Response to Multiple Stresses. *J Agric Food Chem.* 2018;66(15):3899-3909. doi:10.1021/acs.jafc.8b00515
14. Nakata H, Hinosaka M, Yanagimoto H. Macrocyclic-, polycyclic-, and nitro musks in cosmetics, household commodities and indoor dusts collected from Japan: Implications for their human exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;111:248-255. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.032
15. Kim DY, Choi BY. Costunolide—A Bioactive Sesquiterpene Lactone with Diverse Therapeutic Potential. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2926. doi:10.3390/ijms20122926
16. Włoch A, Stygar D, Bahri F, et al. Antiproliferative, antimicrobial and antiviral activity of β -aryl- δ -iodo- γ -lactones, their effect on cellular oxidative stress markers and biological membranes. *Biomolecules.* 2020;10(12):1594. doi:10.3390/biom10121594
17. Häkkinen ST, Soković M, Nohynek L, et al. Chicory extracts and sesquiterpene lactones show potent activity against bacterial and fungal pathogens. *Pharmaceutics.* 2021;14(9):941. doi:10.3390/ph14090941

18. Corlay N, Lecsö-Bornet M, Leborgne E, et al. Antibacterial Labdane Diterpenoids from *Vitex vestita*. *J Nat Prod*. 2015;78(6):1348-1356. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00206
19. Wińska K, Grabarczyk M, Mączka W, et al. Biotransformation of bicyclic halolactones with a methyl group in the cyclohexane ring into hydroxylactones and their biological activity. *Molecules*. 2016;21(11):1453. doi:10.3390/molecules21111453
20. Mazur M, Gładkowski W, Podkowik M, et al. Lactones 43. New biologically active lactones: β -cyclocitral derivatives. *Pest Manag Sci*. 2014;70(2):286-294. doi:10.1002/ps.3557
21. Drogosz J, Janecka A. Helenalin - A Sesquiterpene Lactone with Multidirectional Activity. *Curr Drug Targets*. 2018;20(4):444-452. doi:10.2174/1389450119666181012125230
22. Kim WS, Choi WJ, Lee S, et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2015;19(1):21-27. doi:10.4196/kjpp.2015.19.1.21
23. Appalasamy S, Lo KY, Ch'Ng SJ, Nornadia K, Othman AS, Chan LK. Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from in vitro plantlets of *Artemisia annua* L. *Biomed Res Int*. 2014;2014:215872. doi:10.1155/2014/215872
24. Boulanger D, Brouillette E, Jaspas F, et al. Helenalin reduces *Staphylococcus aureus* infection in vitro and in vivo. *Vet Microbiol*. 2007;119(2-4):330-338. doi:10.1016/j.vetmic.2006.08.020
25. Ivanescu B, Miron A, Corciova A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. *J Anal Methods Chem*. 2015;2015:247685. doi:10.1155/2015/247685
26. Shen W, Mao H, Huang Q, Dong J. Benzenediol lactones: A class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities. *Eur J Med Chem*. 2015;97(1):747-777. doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.067
27. Salazar-Gómez A, Ontiveros-Rodríguez JC, Pablo-Pérez SS, Vargas-Díaz ME, Garduño-Siciliano L. The potential role of sesquiterpene lactones isolated from medicinal plants in the treatment of the metabolic syndrome – A review. *South African J Bot*. 2020;135:240-251. doi:10.1016/j.sajb.2020.08.020
28. Dhyani P, Sati P, Sharma E, et al. Sesquiterpenoid lactones as potential anti-cancer agents: an update on molecular mechanisms and recent studies. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):1-18. doi:10.1186/s12935-022-02721-9
29. Babaei G, Aliarab A, Abroon S, Rasmi Y, Aziz SGG. Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity. *Biomed Pharmacother*. 2018;106(June):239-246. doi:10.1016/j.biopha.2018.06.131
30. Kuttikrishnan S, Prabhu KS, Al Sharie AH, et al. Natural resorcylic acid lactones: A chemical biology approach for anticancer activity. *Drug Discov Today*. 2022;27(2):547-557. doi:10.1016/j.drudis.2021.10.001
31. Lima LM, Silva BNM da, Barbosa G, Barreiro EJ. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*. 2020;208:112829. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112829
32. Zhou Y, Guo Y, Wen Z, et al. Isoalantolactone enhances the antimicrobial activity of penicillin G against *Staphylococcus aureus* by inactivating β -lactamase during protein translation. *Pathogens*. 2020;9(3):161. doi:10.3390/pathogens9030161
33. Chukwujekwu JC, Van Heerden FR, Van Staden J. Synergistic properties of sesquiterpene lactones isolated from *Centratherum punctatum* Cass. in combination with ampicillin against beta-lactam-resistant Gram-negative bacteria. *South African J Bot*. 2018;117(June 2013):79-82. doi:10.1016/j.sajb.2018.04.003
34. De Kievit TR, Kakai Y, Register JK, Pesci EC, Iglewski BH. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;212(1):101-106. doi:10.1016/S0378-1097(02)00735-8
35. Majik MS, Gawas UB, Mandrekar VK. Next generation quorum sensing inhibitors: Accounts on structure

- activity relationship studies and biological activities. *Bioorganic Med Chem.* 2020;28(21):115728. doi:10.1016/j.bmc.2020.115728
36. Shaaban M, Elgaml A, Habib ESE. Biotechnological applications of quorum sensing inhibition as novel therapeutic strategies for multidrug resistant pathogens. *Microb Pathog.* 2019;127(April 2018):138-143. doi:10.1016/j.micpath.2018.11.043
 37. Kalaiarasan E, Thirumalaswamy K, Harish BN, Gnanasambandam V, Sali VK, John J. Inhibition of quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors. *Microb Pathog.* 2017;111:99-107. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.017
 38. Flamm RK, Rhomberg PR, Sader HS. In vitro activity of the novel lactone ketolide Nafithromycin (WCK 4873) against contemporary clinical bacteria from a global surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(12):e01230-17. doi:10.1128/AAC.01230-17
 39. Hackel MA, Karlowsky JA, Dressel D, Sahn DF. Determination of disk diffusion and MIC quality control ranges for nafithromycin (WCK 4873), a new lactone-ketolide. *J Clin Microbiol.* 2017;55(10):3021-3027. doi:10.1128/JCM.00972-17
 40. Trivedi J, Shaikh J, Chavan N, et al. Pretreatment of nafithromycin attenuates inflammatory response in murine lipopolysaccharide induced acute lung injury. *Cytokine.* 2020;129:155049. doi:10.1016/j.cyto.2020.155049
 41. Veeraraghavan B, Varghese R, Saigal K, et al. Activity of novel lactone ketolide nafithromycin against multicentric invasive and non-invasive pneumococcal isolates collected in India. *JAC-Antimicrobial Resist.* 2021;3(2):3-6. doi:10.1093/jacamr/dlab066
 42. Willke T, Vorlop KD. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;66:131-142. doi:10.1007/s00253-004-1733-0
 43. Hudlicky T, Reed JW. Rapid Formation of Molecular Complexity in Organic Synthesis issue generation in organic synthesis w z. *Chem Soc Rev.* 2009;38:3117-3132. doi:10.1039/b901172m
 44. Adams A, Demyttenaere JCR, Kimpe N De. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* — investigation of the culture conditions. *Food Chem.* 2003;80:525-534.
 45. Hernaiz MJ, Alcantara AR, García JI, Sinisterra J V. Applied Biotransformations in Green Solvents. *Chem a Eur J.* 2010;16:9422-9437. doi:10.1002/chem.201000798
 46. Florindo C, Branco LC, Marrucho IM. Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents. *ChemSusChem.* 2019;12(8):1549-1559. doi:10.1002/cssc.201900147
 47. Pätzold M, Siebenhaller S, Kara S, Liese A, Syldatk C, Holtmann D. Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends Biotechnol.* 2019;37(9):943-959. doi:10.1016/j.tibtech.2019.03.007
 48. Perna FM, Vitale P, Capriati V. Deep eutectic solvents and their applications as green solvents. *Curr Opin Green Sustain Chem.* 2020;21:27-33. doi:10.1016/j.cogsc.2019.09.004
 49. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng.* 2014;2(5):1063-1071. doi:10.1021/sc500096j
 50. Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Redovniković RI. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;112:46-53. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.034
 51. Mora-Diez N, Keller S, Alvarez-Idaboy JR. The Baeyer – Villiger reaction : solvent effects on reaction mechanisms. *Org Biomol Chem.* 2009;7:3682-3690. doi:10.1039/b906058h
 52. Tolmie C, Smit MS, Opperman DJ. Native roles of Baeyer-Villiger monooxygenases in the microbial metabolism of natural compounds. *Nat Prod Rep.* 2019;36(2):326-353. doi:10.1039/c8np00054a
 53. Drozd A, Chrobok A. Chemo-enzymatic Baeyer-Villiger oxidation of 4-methylcyclohexanone via kinetic

- resolution of racemic carboxylic acids: Direct access to enantioenriched lactone. *Chem Commun.* 2016;52(6):1230-1233. doi:10.1039/c5cc08519e
54. Wang XP, Zhou PF, Li ZG, Yang B, Hollmann F, Wang YH. Engineering a lipase B from *Candida antarctica* with efficient perhydrolysis performance by eliminating its hydrolase activity. *Sci Rep.* 2017;7(December 2016):1-5. doi:10.1038/srep44599
55. Gładkowski W, Gliszczyńska A, Siepka M, Czarnecka M, Maciejewska G. Kinetic resolution of (E)-4-(2',5'-dimethylphenyl)-but-3-en-2-ol and (E)-4-(benzo[d][1',3']dioxol-5'-yl)-but-3-en-2-ol through lipase-catalyzed transesterification. *Tetrahedron Asymmetry.* 2015;26(14):702-709. doi:10.1016/j.tetasy.2015.05.006
56. Evans DA, Michael FE, Tedrow JS, Campos KR. Application of chiral mixed phosphorus/sulfur ligands to enantioselective rhodium-catalyzed dehydroamino acid hydrogenation and ketone hydrosilylation processes. *J Am Chem Soc.* 2003;125(12):3534-3543. doi:10.1021/ja012639o
57. Dong X, Weickgenannt A, Oestreich M. Broad-spectrum kinetic resolution of alcohols enabled by Cu-H-catalysed dehydrogenative coupling with hydrosilanes. *Nat Commun.* 2017;8:1-7. doi:10.1038/ncomms15547
58. Kazlauskas RJ, Weissfloch ANE, Rappaport AT, Cuccia LA. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J Org Chem.* 1991;56(8):2656-2665. doi:10.1021/jo00008a016
59. Denmark SE, Burk MT. Lewis base catalysis of bromo- and iodolactonization, and cycloetherification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(48):20655-20660. doi:10.1073/pnas.1005296107
60. Gładkowski W, Skrobiszewski A, Mazur M, et al. Synthesis and anticancer activity of novel halolactones with β -aryl substituents from simple aromatic aldehydes. *Tetrahedron.* 2013;69:10414-10423. doi:10.1016/j.tet.2013.09.094
61. Chambergo FS, Valencia EY. Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(6):2567-2577. doi:10.1007/s00253-016-7305-2
62. Olicón-Hernández DR, González-López J, Aranda E. Overview on the biochemical potential of filamentous fungi to degrade pharmaceutical compounds. *Front Microbiol.* 2017;8(SEP):1-17. doi:10.3389/fmicb.2017.01792
63. Fincker M, Spormann AM. Biochemistry of catabolic reductive dehalogenation. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:357-386. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044829
64. Sari AA, Tachibana S, Itoh K. Determination of co-metabolism for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) degradation with enzymes from *Trametes versicolor* U97. *J Biosci Bioeng.* 2012;114(2):176-181. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.03.006
65. De Jong RM, Dijkstra BW. Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: Different ways to cleave a carbon-halogen bond. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(6):722-730. doi:10.1016/j.sbi.2003.10.009
66. Gładkowski W, Skrobiszewski A, Mazur M, et al. Chiral δ -iodo- γ -lactones derived from cuminaldehyde, 2,5-dimethylbenzaldehyde and piperonal: Chemoenzymatic synthesis and antiproliferative activity. *Tetrahedron Asymmetry.* 2016;27(6):227-237. doi:10.1016/j.tetasy.2016.02.003
67. Gładkowski W, Włoch A, Pawlak A, et al. Preparation of enantiomeric β -(2',5'-dimethylphenyl)bromolactones, their antiproliferative activity and effect on biological membranes. *Molecules.* 2018;23(11):3035. doi:10.3390/molecules23113035
68. Pawlak A, Gładkowski W, Mazur M, Henklewska M, Obmińska-Mrukowicz B, Rapak A. Optically active stereoisomers of 5-(1-iodoethyl)-4-(4'-isopropylphenyl)dihydrofuran-2-one: The effect of the configuration of stereocenters on apoptosis induction in canine cancer cell lines. *Chem Biol Interact.* 2017;261:18-26. doi:10.1016/j.cbi.2016.11.013
69. Pawlak A, Gładkowski W, Kutkowska J, Mazur M, Obmińska-Mrukowicz B, Rapak A. Enantiomeric trans

- β -aryl- δ -iodo- γ -lactones derived from 2,5-dimethylbenzaldehyde induce apoptosis in canine lymphoma cell lines by downregulation of anti-apoptotic Bcl-2 family members Bcl-xL and Bcl-2. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2018;28(7):1171-1177. doi:10.1016/j.bmcl.2018.03.006
70. Gładkowski W, Skrobiszewski A, Mazur M, Siepka M, Białońska A. Convenient chemoenzymatic route to optically active β -aryl- δ -iodo- γ -lactones and β -aryl- γ -iodo- δ -lactones with the defined configurations of stereogenic centers. *European J Org Chem.* 2015;2015(3):605-615. doi:10.1002/ejoc.201403343
 71. Skrobiszewski A, Gładkowski W, Lis M, et al. Laktony. Cz. 45, Synteza hydroksylaktonów z pierścieniem aromatycznym oraz ocena ich aktywności antyfidantnej i antyproliferacyjnej. *Przem Chem.* 2014;93:1637-1643.
 72. Kurihara T, Esaki N. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications. *Chem Rec.* 2008;8(2):67-74. doi:10.1002/tcr.20141
 73. Huyop F, Sudi IY. D-specific dehalogenases, a review. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2012;26(2):2817-2822. doi:10.5504/bbeq.2011.0143
 74. Mori K. Synthesis of optically active pheromones. *Tetrahedron.* 1989;45(11):3233-3298. doi:10.1016/S0040-4020(01)81007-3
 75. Seebach D, Chow HF, Jackson RFW, Sutter MA, Thaisrivongs S, Zimmermann J. ChemInform Abstract: (+)-11,11'-Di-O-methylelaioaphylidene. Preparation from Elaiophylin and Total Synthesis from (R)-3-Hydroxybutyrate and (S)-Malate. *Chem Informationsd.* 1986;17(46):1281-1308. doi:10.1002/chin.198646351
 76. Khor GK, Uzir MH. *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono- and sesquiterpenoids. *Yeast.* 2011;28:93-107. doi:10.1002/yea.1827
 77. Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, et al. Melioidosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4:17107. doi:10.1038/nrdp.2017.107
 78. Khan I, Wieler LH, Melzer F, et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(3):204-221. doi:10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x
 79. Cloutier M, Gauthier C. *3-Deoxy-d-Manno-Oct-2-Ulosonic Acid (Kdo) Derivatives in Antibacterial Drug Discovery.* Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/B978-0-12-816675-8.00004-X
 80. Sampath VP. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agric Nat Resour.* 2018;52(2):115-120. doi:10.1016/j.anres.2018.08.002
 81. Kaszowska M. Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. *Postep Hig Med Dosw.* 2004;58:333-342.
 82. Lodowska J, Wolny D, Ludmiła Węglarz. The sugar 3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) as a characteristic component of bacterial endotoxin - a review of its biosynthesis, function, and placement in the lipopolysaccharide core. *Can J Microbiol.* 2013;59(10):645-655. doi:10.1139/cjm-2013-0490
 83. Laroussarie A, Barycza B, Andriamboavonjy H, Tamigney Kenfack M, Blériot Y, Gauthier C. Synthesis of the tetrasaccharide repeating unit of the β -Kdo-containing exopolysaccharide from *Burkholderia pseudomallei* and *B. cepacia* complex. *J Org Chem.* 2015;80(20):10386-10396. doi:10.1021/acs.joc.5b01823
 84. Kosma P. Progress in Kdo-glycoside chemistry. *Tetrahedron Lett.* 2016;57(20):2133-2142. doi:10.1016/j.tetlet.2016.04.005

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Zajęcia dydaktyczne:

Jestem autorką i współautorką programów kursów realizowanych dla studentów Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt oraz Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Przygotowałam i prowadziłam następujące zajęcia dydaktyczne:

Przygotowanie prezentacji i prowadzenie wykładów z przedmiotów:

Chemia organiczne z elementami chemii nieorganicznej dla studentów kierunku Biologia studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot był prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2013/2014 z przerwą w roku 2015/2016, kiedy przebywałam na stażu naukowym. Jestem autorką sylabusu do tego przedmiotu.

Chemia organiczne z elementami chemii nieorganicznej dla studentów kierunku Biologia Człowieka studia stacjonarne, I stopnia. Przedmiot był prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2014/2015 z przerwą w roku 2015/2016, kiedy przebywałam na stażu naukowym. Jestem autorką sylabusu do tego przedmiotu.

Praktyczne zastosowania naturalnych układów enzymatycznych dla studentów kierunku Biologia studia stacjonarne, II stopnia. Przedmiot był prowadzony przeze mnie od roku akademickiego 2015/2016. Jestem autorką sylabusu do tego przedmiotu.

Opracowanie instrukcji i prowadzenie ćwiczeń laboratoryjnych z przedmiotów:

Wspólnie z dr hab. Tomaszem Janeczko i dr inż. Anną Żołnierczyk opracowałam nowy program ćwiczeń oraz instrukcje z chemii nieorganicznej i chemii organicznej obowiązujące na kierunkach studiów licencjackich oraz inżynierskich: Biologia, Biologia Człowieka, Odnawialne Źródła Energii i Gospodarka Odpadami, Zarządzanie i Inżynieria Produkcji.

Opracowałam program ćwiczeń oraz instrukcję do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu Praktyczne zastosowania naturalnych układów enzymatycznych dla studentów kierunku Biologia.

Uczestniczyłam w opracowaniu ćwiczeń laboratoryjnych w systemie zdalnym oraz hybrydowym z przedmiotu chemii nieorganicznej dla kierunku: Technologia Żywności oraz z przedmiotu chemia organiczna dla kierunku: Biotechnologia

Prowadziłam również ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotów:

- Chemia ogólna i nieorganiczna dla studentów kierunków: Towaroznawstwo, Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka, Żywnienie Człowieka i Dietetyka, Zarządzanie Jakością i Analiza Żywności,
- Chemia organiczna dla studentów kierunków: Biotechnologia, Ochrona Środowiska, Żywnienie Człowieka i Dietetyka.
- Analiza żywności dla studentów kierunku Biotechnologia

Jestem współautorką **27 multimedialnych materiałów dydaktycznych** (filmów) z chemii organicznej oraz chemii ogólnej i nieorganicznej, które umożliwiły prowadzenie ćwiczeń w formie zdalnej lub hybrydowej m. in. dla kierunków Biologia, Biologia Człowieka, Biotechnologia, Żywnienie Człowieka

i Dietetyka. Materiały te zdeponowane są w Bazie Wiedzy UPWr i w chwili obecnej stanowią ogólnodostępną pomoc dydaktyczną.

Opieka nad pracami dyplomowymi:

Promotor prac inżynierskich:

- 1) Sonia Kołt „Zastosowanie lipaz w syntezie aromatów żywności” Data egzaminu dyplomowego: 5 lutego 2015
- 2) Martyna Kosakowicz „Biotechnologiczne metody otrzymywania γ -dekalaktonu” Data egzaminu dyplomowego: 6 lutego 2015
- 3) Kaja Myśliwiec „Abzymy - przeciwciała o aktywności katalitycznej” Data egzaminu dyplomowego: 11 lutego 2016
- 4) Nikola Nowrot „Biotechnologiczne metody produkcji szczepionek” Data egzaminu dyplomowego: 6 lutego 2017
- 5) Dominika Plaskota „Projekt technologiczny kinetycznego rozdziału enancjomerów (*E*)-4-fenylobut-3-en-2-olu” Data egzaminu dyplomowego: 6 lutego 2018
- 6) Pavel Laputski „Analiza możliwości zastosowania mikroorganizmów w procesie biodegradacji triclosanu” Data egzaminu dyplomowego: 4 lutego 2021

Promotor prac magisterskich:

- 1) Anna Kudrynska „Mikrobiologiczne przekształcenia optycznie czynnych β - arylo- γ -laktonów” Data egzaminu dyplomowego: 4 lipca 2018
- 2) Karolina Przysiężna „Mikrobiologiczne przekształcenia laktonowych pochodnych acetylocykloheksenu” Data egzaminu dyplomowego: 12 lipca 2019
- 3) Aleksandra Zagała „Biotransformacje cyklicznych ketonów otrzymanych z naturalnych aldehydów” Data egzaminu dyplomowego: 18 lipca 2019
- 4) Magdalena Żeleźnik „ Analiza ilościowa i jakościowa produktów chemoenzymatycznej syntezy cyklicznych pochodnych benzaldehydu.” Data egzaminu dyplomowego: 18 lipca 2019
- 5) Monika Malska „Chemo-enzymatyczne utlenienie Baeyera-Villigera 2-(4'-metylobenzylo)cyklopentanonu i 1-tetralonu” Data egzaminu dyplomowego: Data egzaminu dyplomowego: 15 lipca 2021
- 6) Natalia Roszkowska „Biotransformacje 2-(4'-izopropylobenzylo)cyklopentanonu” Data egzaminu dyplomowego: 15 lipca 2021
- 7) Nikola Woźniak „Biotransformacje cyklicznych ketonów” Data egzaminu dyplomowego: 6 lipca 2022
- 8) Viktoriia Mandryka „Mikrobiologiczne i chemo-enzymatyczne przekształcenia cyklicznych ketonów” – praca w realizacji

Pełniłam również funkcję recenzenta, oceniając łącznie 11 prac dyplomowych – pięciu prac inżynierskich oraz sześciu prac magisterskich

Prowadzona działalność popularyzatorska związana jest z moją współpracą z Fundacją Uniwersytet Dzieci, którą rozpocząłam w 2014 roku. Do tej pory wspólnie z dr Anną Żołnierczyk przygotowałam i przeprowadziłam zajęcia takie jak „Czy kuchnię można zmienić w laboratorium chemiczne?” (warsztaty 2014r), „Jak poznajemy świat?” (wykład 2014r), „Czy jedzenie przygotowane w ciekłym azocie ma zapach?” (warsztaty 2019), „Tworzymy ekologiczne środki czystości i kosmetyki” (warsztaty online listopad 2021- luty 2022).

Od 2013 prowadzę również zajęcia w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki. W ramach tej inicjatywy współorganizowałam następujące pokazy, wykłady i warsztaty: warsztaty „Kuchnia Molekularna” (2013, 2014, 2015, 2022), pokazy „Sztuczki Chemiczne” (2015), wykład „Jak ugryźć robala - insekty w diecie” (2017), warsztaty „Kolorowa Chemia” (2018, 2020), pokaz „Radość eksperymentowania” (2019), wykład „Owady od kuchni” (2020, 2021, 2022).

Od 23 października 2013 do października 2022 byłam jednym z **opiekunów Koła Naukowego Kuchni Molekularnej**. W ramach działalności Koła realizowane były prace naukowe oraz organizowane były projekty edukacyjne. W latach 2014-2015 zrealizowano trzy projekty zatytułowane „Między łąką a Lasem” (<https://foodthinktank.pl/miedzylakaalasem>), „Sad i Ogień” (<https://foodthinktank.pl/sadiogien>) oraz „Ziemia i Woda” (<https://foodthinktank.pl/ziemiaiwodabwa>). Wszystkie wymienione projekty umożliwiły współpracę ze środowiskiem szefów kuchni zajmujących się tzw. kuchnią molekularną wykorzystującą techniki laboratoryjne w procesie przygotowania i obróbki żywności. W projektach, oprócz licznej grupy studentów, brała udział szeroka grupa osób współpracujących m.in. rolników, fotografów, filmowców, dźwiękowców, rzemieślników, architektów oraz barmanów i baristów. Celem projektów było wykorzystanie wiedzy laboratoryjnej oraz świadome wykorzystanie zjawisk fizycznych i chemicznych w celu otrzymania produktów spożywczych o niespotykanych teksturach, smakach i zapachach. Dodatkowym celem było również poszerzenie wiedzy odnośnie możliwości zastosowania regionalnych i dziko żyjących roślin do przygotowania potraw. Finał wydarzenia stanowiła uroczysta kolacja. W przypadku projektu „Między łąką a Lasem” została ona zorganizowana w patio Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Trzeci ze zrealizowanych projektów „Ziemia i Woda” zakończył się **wystawą w galerii Dizajn BWA Wrocław** (otwarta 13 marca - 25 marca 2015).

Angażowałam się również w organizowaniu Dni Otwartych Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności (2018, 2021) oraz Dni Przyrodników organizowanych przez UPWr w Pawłowicach (2022).

W ramach działalności popularyzatorskiej współorganizowałam także różnego rodzaju pokazy i warsztaty Kuchni Molekularnej m.in. w ramach ogólnopolskiego seminarium „Nowe trendy w sztuce kulinarnej. Specjały kuchni Dolnośląskiej i Czeskiej” organizowanym przez Krajowe Centrum Edukacji Rolniczej w Brwinowie (18.10.2013) czy w ramach kolegium prorektorów ds. studenckich i kształcenia Wrocławia, Opola i Zielonej Góry (11.03.2014).

Byłam również zaangażowana w organizację konferencji naukowych. W latach 2015, 2017, 2018, 2019 i 2022 - byłam członkiem wydziałowego komitetu organizacyjnego Międzynarodowej Konferencji Studenckich Kół Naukowych organizowanej na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Brałam również udział w organizacji trzech krajowych konferencji. Na dwóch z nich pełniłam i obecnie pełnię funkcję sekretarza (Załącznik 3., II, 8.2.7. i 8.2.9).

Jestem także współautorem szeregu opracowań patentowych, które zdobyły nagrody w konkursach ogólnopolskich i międzynarodowych:

- Srebrny medal targów 48th International Exhibition of Inventions Geneva (2021 rok) za Cykl 45 wynalazków dotyczących wytwarzania bioaktywnych związków flawonoidowych uzyskanych w wyniku biotransformacji. Autorzy: mgr inż. Mateusz Łużny, dr Ewa Kozłowska, dr Monika Dymarska, mgr inż. Martyna Krzywda, dr hab. Tomasz Janeczko, prof. dr hab. Edyta Kostrzewa-Susłow, dr inż. Marcelina Mazur, dr inż. Jarosław Popłoński, dr inż. Tomasz Tronina, dr inż. Sandra Sordon.
- Srebrny medal w konkursie IWIS 2020 (International Warsaw Invention Show), za cykl opracowań patentowych dotyczący uzyskiwania biologicznie aktywnych związków flawonoidowych w wyniku biotransformacji. Autorzy: mgr inż. Mateusz Łużny, dr Ewa Kozłowska, dr Dymarska Monika, mgr inż. Martyna Krzywda, dr hab. Tomasz Janeczko, prof. dr hab. Edyta Kostrzewa-Susłow, dr inż. Marcelina Mazur, dr inż. Jarosław Popłoński, dr inż. Tomasz Tronina, dr inż. Sandra Sordon.
- Główna nagroda w X edycji Ogólnopolskiego Konkursu Student-Wynalazca (2020 rok): Mateusz Łużny, Ewa Kozłowska, Monika Dymarska, Martyna Krzywda z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz opiekunowie naukowci: dr hab. Tomasz Janeczko, dr hab. Edyta Kostrzewa-Susłow, dr inż. Marcelina Mazur, dr inż. Jarosław Popłoński, dr inż. Tomasz Tronina, dr inż. Sandra Sordon – za rozwiązanie Cykl 45 wynalazków dotyczących wytwarzania bioaktywnych związków flawonoidowych w wyniku biotransformacji. Opisywane związki mogą zostać zastosowane jako substancje czynne leków, lub składniki produktów spożywczych (suplementów diety). Posiadają m.in. właściwości antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe, antydiabetyczne, antybakteryjne, przeciwwgrzybicze czy przeciwwirusowe. Otrzymane związki charakteryzują się słodkim smakiem, stąd istnieje możliwość wytworzenia z nich niskokalorycznych słodzików o smaku odpowiadającym sacharozie, ale posiadających jednocześnie właściwości prozdrowotne.

Udział w pracach organów kolegialnych uczelni:

- Członkostwo w Rektorskiej Komisji ds. Socjalnych i Mieszkaniowych
- Członkostwo w Komisjach Rekrutacyjnych na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności. W roku akademickim 2022/23 pełnię funkcję sekretarza Komisji Rekrutacyjnej.
- Członkostwo w trzech komisjach doktorskich powołanych do przeprowadzenia postępowania doktorskiego mgr inż. Pawła Mituły, mgr inż. Moniki Dymarskiej oraz mgr inż. Agnieszki Krawczyk-Łebek. We wszystkich trzech komisjach pełniłam funkcję sekretarza.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć

Moja zainteresowanie związkami laktonowymi rozpoczęło się na etapie realizacji pracy magisterskiej, której promotorem był prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk. Praca ta była prowadzona w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu a jej naturalną kontynuacją stała się praca doktorska wykonana również pod kierunkiem prof. dr hab. Czesław Wawrzeńczyk dotycząca syntezy i mikrobiologicznych przekształceń chlorowcolaktonów. W pracy opisano syntezę chemiczną bicyklicznych chlorowcolaktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu ale także γ -laktonów z podstawnikiem *p*-metoksyfenylohem. Przedstawiono również szereg przekształceń tych związków prowadzonych w kulturach grzybów strzępkowych, głównie z gatunków *Absidia cylindrospora*, *Absidia glauca*, *Nigrospora oryzae* oraz *Mortirella vinaceae*. Przeprowadzone biotransformacje pozwoliły na uzyskanie szeregu produktów hydroksylacji oraz dehalogenacji chlorowcolaktonów. Mikrobiologiczne przekształcenia bicyklicznych jodolaktonów z układem alkilopodstawionego cykloheksanu w kulturze szczepu *Absidia cylindrospora* AM336 prowadziły głównie do hydrolitycznej dehalogenacji substratów. Natomiast w przypadku jodolaktonu z układem trimetylocykloheksanu można było zaobserwować zaskakujący szlak przekształceń. Oprócz typowego produktu hydrolitycznej dehalogenacji, powstawał także produkt dehydrohalogenacji, utlenienia wiązania podwójnego oraz wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej połączonej z translaktonizacją.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej nawiązałam również współpracę z firmą Jelfa co zaowocowało przyznaniem stypendium w ramach projektu „Przedsiębiorczy doktorant – inwestycja w innowacyjny rozwój regionu” (Zał. 3., II, 9.1.1.). Badania prowadzone w ramach tego stypendium wpisywały się w tematykę doktoratu i dotyczyły syntezy chemicznej oraz określenia właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych chlorowcolaktonów otrzymanych z naturalnych aldehydów – β -cyklocitralu oraz aldehydu anyżowego. W wyniku syntez, której substratem był aldehyd anyżowy udało się wydzielić siedem chlorowcolaktonów. Jako produkty jodolaktonizacji otrzymano *cis*- oraz *trans*- δ -jodo- γ -laktony. Z mieszaniny produktów bromolaktonizacji wydzielono *cis*- i *trans*- δ -bromo- γ -lakton oraz γ -bromo- δ -lakton. Analogiczne produkty otrzymano również w reakcji chlorolaktonizacji. Dodatkowo przeprowadzono również reduktywną dehalogenację *cis*- δ -jodo- γ -laktonu w celu otrzymania pochodnej nie zawierającej atomu chlorowca. W przypadku syntezy, której substratem był β -cyklocitral reakcja laktonizacji uzyskanego na szlaku przekształceń kwasu prowadziła do otrzymania racemicznych δ -chlorowco- γ -laktonów, jako jedynych produktów. Również w tym wypadku prowadzono reduktywną dehalogenację bromolaktonu za pomocą wodoru tri-*n*-butylocyny.

Ponieważ większość z otrzymanych połączeń nie była opisana wcześniej w literaturze przeprowadzono szereg badań określających ich aktywność biologiczną w tym przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą oraz właściwości antyfidantne względem szkodników magazynów zbożowych. Badania te były prowadzone w Katedrze Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej we Wrocławiu oraz w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Laktony otrzymane w wyniku reduktywnej dehalogenacji wykazywały aktywność przeciwbakteryjną szczególnie względem testowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* natomiast były nieaktywne w testach prowadzonych na patogennych grzybach dermatofitycznych (*Trichophyton rubrum*) oraz drożdżakach (*Candida albicans*). We współpracy z prof. dr hab. Janem Nawrotem z Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu zostały wykonane testy aktywności antyfidantnej względem szkodników magazynów zbożowych.

Chlorolaktony wykazywały w tym przypadku dobrą bądź bardzo silną aktywność deterentą, szczególnie względem chrząszczy i larw Trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.). Uzyskane w toku realizacji pracy doktorskiej wyniki opublikowane zostały w czasopismach *Przemysł Chemiczny* (Zał. 3., II, 4.1.1.1.), *Enzyme and Microbial Technology* (Zał. 3., II, 4.1.1.2.), *Pest Management Science* (Zał. 3., II, 4.1.2.2. i 4.1.2.6.) oraz *Journal of Bioscience and Bioengineering* (Zał. 3., II, 4.1.2.3.).

Po uzyskaniu stopnia doktora pozostając członkiem zespołu prof. Czesława Wawrzeńczyka i współpracując z dr hab. Witoldem Gładkowskim profesorem uczelni, brałam udział w realizacji badań dotyczących chemoenzymatycznej syntezy optycznie czynnych β -fenylopodstawionych chlorowcolaktonów z prostych aldehydów aromatycznych i oceny ich aktywności antyproliferacyjnej. Ze względu na obecność pierścieni aromatycznych w cząsteczkach wiele laktonów wykazuje szeroko udokumentowaną w literaturze aktywność antyproliferacyjną. Stała się ona inspiracją do podjęcia badań w celu otrzymania tej grupy związków. Substratami w zaplanowanych syntezach były naturalne, aromatyczne aldehydy: aldehyd benzoesowy, *p*-metylobenzoesowy, 2,5-dimetylobenzoesowy kuminowy i piperonal.

Dla części z uzyskanych na drodze chemoenzymatycznej syntezy laktonów możliwe było wyznaczenie konfiguracji absolutnych centrów chiralności na podstawie analizy krystalograficznej, wykonanej przez dr hab. Agatę Białońską z Zakładu Krystalografii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wyniki tej analizy wykazały, że *cis*- δ -jodo- γ -laktony oraz *trans*,*cis*- γ -jodo- δ -laktony otrzymane z *S*-enancjomerów kwasów posiadały konfiguracje 4*R*,5*R*,6*S*, natomiast ich enancjomery uzyskano jako produkty laktonizacji kwasów o konfiguracji *R*. Otrzymane na szlaku syntezy związki laktonowe badano pod kątem wykazywanej przez nie aktywności antyproliferacyjnej względem dwóch wybranych linii komórek nowotworowych: Jurkat (linia białaczki T komórkowej człowieka) oraz D-17 (kostniakomęsak psa). W pierwszej kolejności badaniom poddano chlorowcolaktony racemiczne. Wyniki wykazały, iż największą aktywność antyproliferacyjną względem komórek linii Jurkat, porównywalną ze stosowaną jako kontrola karboplatyną, wykazywał *cis*- δ -jodo- γ -lakton z podstawnikiem *p*-izopropylofenylowym. Stosunkowo wysoką aktywność, wobec obu linii komórkowych, wykazał również *trans* izomer δ -bromo- γ -laktonu z podstawnikiem *p*-metylofenylowym oraz *cis*- δ -bromo- γ -lakton jak i *cis*- δ -chloro- γ -lakton z niepodstawionym pierścieniem fenylowym.

Kolejny etap badań aktywności antyproliferacyjnej dotyczył otrzymanych enancjomerów *cis*- i *trans*- δ -jodo- γ -laktonów o ustalonych konfiguracjach absolutnych centrów chiralności. Sugerując się wysoką aktywność racemicznego *cis*- δ -jodo- γ -laktonu otrzymanego z aldehydu kuminowego do badań wybrano enancjomery tego związku, jak również enancjomery jego izomeru *trans* oraz pojedyncze enancjomery laktonów otrzymanych z 2,5-dimetylobenzaldehydu oraz piperonalu. Związki te testowano, oprócz dwóch poprzednich linii komórek nowotworowych, również wobec linii GL-1 (ostra białaczka B-komórkowa) i CLBL-1 (chłoniak B-komórkowy). W tym przypadku izomery *trans* były bardziej aktywne od izomerów *cis*. Najniższe wartości IC₅₀ odnotowano dla pojedynczych enancjomerów *trans*-(4*S*,5*R*,6*S*)- δ -jodo- γ -laktonu otrzymanego z piperonalu oraz *trans*-(4*S*,5*R*,6*S*)- δ -jodo- γ -laktonu otrzymanego z 2,5-dimetylobenzaldehydu. W przypadku izomerów *cis* obserwowane relacje między aktywnością obu enancjomerów były zmienne w zależności od rodzaju podstawnika aromatycznego i testowanej linii komórkowej. Wszystkie uzyskane wyniki opublikowane zostały w czasopismach *Tetrahedron* (Zał. 3., II, 4.1.2.1.), *European Journal of Organic Chemistry* (Zał. 3., II, 4.1.2.4.), *Tetrahedron: Asymmetry* (Zał. 3., II, 4.1.2.7.).

Aktywność antyproliferacyjna wybranych związków laktonowych była również dokładnie badana pod kątem mechanizmu ich działania. Badania te wykonano w Katedrze Biochemii, Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w zespole prof. Bożeny Obmińskiej-Mrukowicz. Cztery stereoisomery *cis*- i *trans*- δ -jodo- γ -laktonów z podstawnikiem *p*-izopropylfenylovym o udowodnionym we wcześniejszych badaniach działaniu antyproliferacyjnym poddano odpowiednio zaplanowanym testom *in vitro*. Badania prowadzone były wobec panelu psich linii komórkowych reprezentujących nowotwory hematopoetyczne (CLBL-1, GL-1, CL-1, CLB70) i komórki nowotworowe gruczołu sutkowego (P114, CMT-U27, CMT-U309). W celu określenia aktywności przeciwnowotworowej badanych związków sprawdzono żywotność komórek i aktywność metaboliczną komórek za pomocą barwienia jodkiem propidyny oraz testu MTT. Aby określić, czy badane związki powodują nekrotyczną czy apoptotyczną śmierć komórki, przeprowadzono dwa testy oceny apoptozy, barwienie aneksyną V i wykrywanie aktywacji kaspazy 3/7. Jednocześnie określono wpływ laktonów na cykl komórkowy. Badane izomery związków laktonowych wykazywały większą aktywność wobec linii komórkowych chłoniaka i białaczki psów niż wobec nowotworów sutka. Wykazano, że spośród testowanych związków najwyższą aktywność wykazywał (-)-*cis*-(4*S*,5*S*,6*R*)-5-(1-iodoetylo)-4-(4'-isopropylfenylo)dihydrofuran-2-on. Mechanizm działania badanych związków związany był z inicjowaniem procesów apoptozy, nie działały natomiast jak typowe czynniki cytostatyczne. W kolejnych badaniach prowadzonych dla enancjomerów 5-(1-iodoetylo)-4-(2',5'-dimetylofenylo)dihydrofuran-2-onu stwierdzono, że oba indukują klasyczną apoptozę zależną od kaspazy poprzez obniżenie ekspresji antyapoptotycznych białek Bcl-xL i Bcl-2. Chociaż mechanizm indukcji apoptozy był taki sam dla obu enancjomerów, różniły się one efektywnością działania, gdyż silniejszą aktywność przeciwnowotworową *in vitro* wykazywał izomer (+)-(4*R*,5*S*,6*R*). Wyniki przeprowadzonych badań opublikowano w czasopismach *Chemico-biological interactions* (Zał. 3., II, 4.1.2.9.) oraz *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Zał. 3., II, 4.1.2.12.).

Efektem współpracy z dr hab. Marylą Szczepanik z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz z dr Andrzejem Skrobiszewskim była publikacja, która ukazała się w czasopiśmie *Molecules* (Zał. 3., II, 4.1.2.13.) i dotyczyła stereoselektywnej hydrolizy racemicznych β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów katalizowana przez szczep *Aspergillus ochraceus* AM370, jako narzędzia do otrzymywania zarówno enancjomerycznie wzbogaconych (*S*)- γ -etylideno- γ -laktonów, jak i (+)-(*R*)- γ -ketokwasyów. Dodatkowo większość β -arylo- γ -etylideno- γ -laktonów wykazywała silną aktywność antyfidantną względem mącznika młynarka *Alphitobius diaperinus* Panzer.

W ramach badań nad otrzymywaniem aktywnych biologicznie laktonów z pierścieniem aromatycznym nawiązałam również współpracę z dr hab. Barbarą Żarowską, oraz dr Moniką Siepką. Efektem tej współpracy było otrzymanie w wyniku pięcioetapowej syntezy sześciu racemicznych γ -oxa- ϵ -laktonów, które w większości przypadków hamowały wzrost wybranych bakterii chorobotwórczych (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus*), grzybów strzępkowych (*Fusarium graminearum*, *Aspergillus niger* i *Alternaria* sp.) oraz drożdży (*Candida albicans*). Wyniki opublikowano w czasopiśmie *Molecules* (Zał. 3., II, 4.1.2.15.).

Moje dalsze plany naukowe to kontynuowanie badań dotyczących zastosowania rozpuszczalników głęboko eutektycznych jako medium w procesach biotransformacji oraz badanie wpływu tych rozpuszczalników na enancjoselektywność procesów biokatalizy. Interesującym mnie szczególnie zagadnieniem jest wpływ zastosowania DES-ów na enancjoselektywność procesów bio redukcji wiązania podwójnego w cząsteczkach α,β -nienasyconych ketonów. Natomiast drugim

nurtem badań, które chciałabym rozwijać jest możliwości wykorzystania DES-ów w procesach izolowania związków biologicznie aktywnych z produktów ubocznych przemysłu rolno-spożywczego oraz możliwości bezpośredniego zastosowania takich mieszanin jako dodatków do żywności czy produktów kosmetycznych.

Podsumowując mój dorobek naukowy (dane na dzień 22.05.2023r), łącznie z publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia naukowego wymienionego w pkt. 4 autoreferatu, obejmuje 26 oryginalnych prac twórczych, (w tym 23 w publikacjach z bazy JCR), 3 artykułów przeglądowych oraz 2 rozdziałów w podręcznikach akademickich, a także 31 patentów. Sumaryczny impact factor (IF) publikacji wynosi 85,049, liczba punktów MEiN za publikacje 1337, liczba cytowań publikacji wg bazy Scopus wynosi 292 (w tym bez autocytowań 153), a indeks Hirscha 11. Według bazy Web of Science liczba cytowań publikacji wynosi 246 (w tym bez autocytowań 191), a indeks Hirscha 10. Wyniki badań prezentowałem w formie wykładu przedstawionego na zaproszenie oraz 5 referatów wygłoszonych na konferencjach krajowych oraz międzynarodowych. Były one również przedmiotem 33 komunikatów konferencyjnych. W latach 2012, 2013, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021 i 2022 otrzymałem w sumie 11 Nagród Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za działalność naukową. Szczegółowy wykaz mojego dorobku naukowego zawiera załącznik 3, a jego podsumowanie z wydzieleniem okresu po uzyskaniu stopnia doktora, przedstawia poniższa tabela.

Podsumowanie efektów działalności naukowo-badawczej

Kategorie opracowań	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	Liczba	Punkty MEiN	IF	Liczba	Punkty MEiN	IF	Liczba	Punkty MEiN	IF
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z IF	2	45	2,781	20	1155	77,046	22	1225	79,827
Artykuły przeglądowe	2	6	-	1	70	5,222	3	82	5,222
Rozdziały w podręcznikach	1	3	-	1	-	-	2	6	-
Razem publikacje	5	54	2,781	22	1225	82,268	27	1337	85,049
Patenty	3	75	-	28	1695	-	31	1770	-
RAZEM liczba opracowań; punkty MEiN oraz IF	8	129	2,781	50	2920	82,268	58	3049	85,049

Mazur Marcelina

(podpis wnioskodawcy)