



**WYDZIAŁ
CHEMII**

Uniwersytet Łódzki

**UNIWERSYTET ŁÓDZKI
WYDZIAŁ CHEMII
KATEDRA CHEMII ORGANICZNEJ I STOSOWANEJ**

ul. Tamka 12
91-403 Łódź
tel. (+48) 42 635 57 73
katchois@uni.lodz.pl

Dr hab. Anna Zawisza, prof. UŁ
e-mail: azawisza@chemia.uni.lodz.pl
tel: (42) 635 58 02

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Ferenc

pt. „Synteza i ocena aktywności biologicznej pochodnych urydyny, jako potencjalnych inhibitorów syntazy chitynowej”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Ferenc wykonana została w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach pod kierunkiem dr hab. inż. Ilony Wandzik, prof. Politechniki Śląskiej.

Naukowa ranga i znaczenie osiągnięć w dziedzinie chemii węglowodanów jak i syntezy związków biologicznie aktywnych grupy Prof. Wandzik, upoważniają mnie do stwierdzenia, że mgr Ferenc wykonywała swoją pracę doktorską w bardzo dobrym laboratorium, dysponującym ugruntowaną wiedzą i możliwościami technicznymi do przeprowadzenia związanych z tematem pracy badań.

Rozprawa liczy 149 ponumerowanych stron i ma bardzo przyjemną szatę graficzną, co niewątpliwie ułatwia jej czytanie. Również pod względem edytorskim praca prezentuje się bardzo dobrze, a zauważone drobne i nieliczne błędy językowe nie zasługują na wzmiankę.

Praca ma układ typowy dla prac z zakresu chemii organicznej czy bioorganicznej – składa się z trzech głównych części o zbliżonej długości, to jest przeglądu literaturowego związanego z tematyką badań, prezentacji otrzymanych wyników badań wraz z dyskusją i części eksperymentalnej. W pracy znajduje się 208 odnośników do literatury.

We wstępie do pracy Doktorantka uzasadnia wybór tematyki, dowodząc, konieczności poszukiwania nowych inhibitorów syntazy chitynowej - enzymu katalizującego syntezę chityny, stanowiącej podstawowy składnik ściany komórkowej grzybów. Biorąc pod uwagę fakt, że ściana komórkowa nie występuje w komórkach ssaków, syntaza chitynowa jest

obiecującym celem molekularnym przy projektowaniu nowych, selektywnych, a przez to bezpiecznych środków grzybobójczych. Jest to cel tym bardziej godny uwagi, że liczba tego typu infekcji rośnie z roku na rok, a skuteczność dotychczas stosowanego leczenia przeciwgrzybiczego jest ograniczona ze względu na rozwój lekooporności grzybów, jego toksyczność i interakcje z innymi lekami oraz koszt. Z wymienionych powodów uznaję wybrany temat recenzowanej pracy doktorskiej za ważny, zarówno ze względu

poznańczych jak i aplikacyjnych.

Doktoranka bazując na doniesieniach literaturowych o istniejących inhibitorach syntazy chitynowej, jak również najnowszych koncepcjach w projektowaniu struktur potencjalnych inhibitorów oraz aktywności przeciwgrzybiczej już otrzymanych, jasno formułuje cel pracy, którym było opracowanie metod syntazy pochodnych urydyny, a także ocena ich aktywności biologicznej. Temu też zagadnieniu poświęcona jest część literaturowa pracy, która stanowi doskonałe wprowadzenie do badań własnych Doktoranki.

Pomimo drobnych błędów, np. we wzorach związków, właściwy układ całego „Przebiegu literaturowego” i inteligentny dobór przykładów jednoznacznie świadczą o dobrym rozeznaniu Doktoranki w literaturze przedmiotu i stanowi duże ułatwienie dla czytelnika pracy.

Doktoranka rozpoznała przebieg literaturowy od wskazaniami podobieństw i różnic w budowie komórek grzybów i ssaków. Następnie dokonuje podziału dostępnych na rynku leków przeciwgrzybiczych pod względem miejsca, na które ich działanie jest skierowane. Podaje przykłady leków naruszających strukturę błony komórkowej, naruszających strukturę ściany komórkowej czy hamujących syntezę kwasów nukleinowych. Te części przebiegu kończy opisem gryzoconuwiny, leku o złożonym mechanizmie działania, polegającym na zablokowaniu zarówno syntazy ściany komórkowej jak i hamowaniu syntazy RNA. W kolejnym podrozdziale Doktoranka podaje pełną charakterystykę syntazy chitynowej oraz opisuje mechanizm jej działania. Szczególną wagę Doktoranka poświęca doniesieniom o istniejących inhibitorach syntazy chitynowej, najnowszym koncepcjach w projektowaniu struktur potencjalnych inhibitorów oraz aktywności przeciwgrzybiczej już otrzymanych związków. Koncząc przebieg literaturowy Autorka podaje przykłady terapii skojarzonych w leczeniu grzybic, wskazując jednocześnie na brak skutecznego połączenia inhibitora syntazy glukanu i chityny, które miałyby zastosowania kliniczne.

Lektura tego rozdziału daje mi podstawę do stwierdzenia, że przeprowadzone studia literaturowe były solidnym fundamentem do projektowania i realizacji badań własnych, opisanych w następnym rozdziale.

A oto kilka uwag dotyczących tej części pracy:

- błędnie podano wzór chityny (Rys. 1, str. 8);
- zamieniono wzory mykafunginy i anidulafunginy (Rys. 4, str. 11);
- Autorka na str. 12 pisze: „Chityna jest liniowym polisacharydem strukturalnie zbliżonym do celulozy. Różnica polega na budowie jednostki glukozyłowej...” Być może bardziej odpowiednie byłoby tu stwierdzenie, że różnica polega na budowie jednostki glukopiranozowej;
- błędnie podano wzór Polioksyny D (Tab. 6, str. 29; Tab. 7, str. 31) oraz Polioksyny B (Rys. 19, str. 36);
- błędnie podano rok wydania i stronę w odnośniku [98], zamiast **2015**, 1-10 powinno być **2016**, 31, 219-228;
- Na Rys. 18 powinien znaleźć się wzór Polioksyny B, a nie jak napisano wzór Polioksyny D; ponadto zamieszczony wzór nie przedstawia żadnej z tych struktur;
- wartość MIC podana dla ostatniej pochodnej zamieszczonej w Tab. 9 wynosi >20; podana wartość 2.3 dotyczy pochodnej zawierającej grupę OH, a nie NH₂ przy atomie węgla w sąsiedztwie atomu P.

Kolejny rozdział zajmujący strony od 49 do 96 zatytułowany „Omówienie wyników” Autorka zaczyna przypomnieniem i dokładniejszym sprecyzowaniem głównego celu zaplanowanych badań, po czym następuje szczegółowy opis i dyskusja przeprowadzonych syntez i analiz otrzymanych związków. Z uwagi na to, że większość uzyskanych wyników przeszła już proces recenzji w czasopiśmie, rola recenzenta jest uproszczona.

Autorka w oparciu o doniesienia literaturowe zaprojektowała 20 nowych struktur **P1-P20**. Wszystkie pochodne posiadały fragment urydyny, ze względu na jej znaczący udział w wiązaniu substratu w centrum aktywnym syntazy chitynowej. Mając na uwadze metalozależność syntazy chitynowej, do struktur nowych pochodnych wprowadziła ugrupowania iminowe bądź hydrazonowe, posiadające zdolność do tworzenia wiązań koordynacyjnych z kofaktorami syntazy chitynowej (**P1-P5**). Z kolei wprowadzając pierścienie aromatyczne oraz grupy alkilowe chciała obniżyć polarność nowych pochodnych, a tym samym poprawić ich potencjalne przenikanie przez błonę komórkową (**P10-P20**). Opierając się na hipotezie dwóch miejsc aktywnych syntazy chitynowej, Autorka postanowiła porównać aktywność nowych monourydynowych pochodnych z amidowymi pochodnymi zawierającymi dwie jednostki urydyny **P7-P9**, dającymi szansę na jednoczesne zablokowanie dwóch miejsc aktywnych enzymu. Z kolei pochodna **P6**, zawierająca pierścień

cykloheksylowy, została zaproponowana ze względu na podobieństwo strukturalne do naturalnego substratu enzymu (UDP-GlcNAc) jak i nikkomycyny Z. Uważam, że zaproponowane przez Autorkę struktury zostały zaprojektowane w bardzo przemyślany sposób i dają możliwość realizacji głównego celu pracy. Kluczowymi substratami w syntezach był aldehyd urydynowy **S3** oraz pochodne 5'-aminourydyny **S4** i **S5**. Pochodne hydrazonów **P1-P5** Autorka otrzymała w reakcji aldehydu urydynowego **S3** z odpowiednimi pochodnymi hydrazyny. We współpracy z dr hab. Aleksandra Dąbrowską z Uniwersytetu Gdańskiego Autorka przeprowadziła także wstępną ocenę powinowactwa jonów Mn(II) do hydrazonu **P1** metodą miareczkowania spektrofotometrycznego i zaproponowała strukturę chylatu **P1** z jonami Mn²⁺. Amidowe pochodne urydyny **P6-P20** zostały otrzymane w reakcjach kondensacji substratów aminowych **S4** i **S5** z grupą karboksylową kwasu bursztynowego lub glicyny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka niejednokrotnie testowała kilka metod otrzymywania zaplanowanych pochodnych, przeprowadzała optymalizacje warunków, tak aby otrzymać zaplanowane struktury w łagodnych warunkach z jak najwyższymi wydajnościami. Określanie chemicznej budowy syntezowanych związków, o tak rozbudowanej strukturze, wymagało od Doktorantki specjalistycznej wiedzy z zakresu chemii organicznej jak i dobrej znajomości technik spektroskopowych.

Kolejna część pracy dotyczyła oceny aktywności związków **P1-P20** wobec syntazy chitynowej izolowanej z drożdży *S. cerevisiae*. Przeprowadzone badania wykazały, że jedynie dwa z nich wykazują zauważalną aktywność w badanym zakresie stężeń: monomeryczna pochodna urydyny **P12** (IC₅₀ = 0.8 mM) oraz dimeryczna pochodna **P9** (IC₅₀ = 3 mM). We współpracy z Katedrą Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu Autorka zbadała zsyntezowane pochodne pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej oraz przeprowadziła badania synergizmu pochodnej **P12** z kaspofunginą. Spośród wszystkich przebadanych związków, jedynie pochodna **P12** wykazywała umiarkowaną aktywność przeciwgrzybiczną wobec wszystkich testowanych szczepów bakterii. Pochodne **P4-P6** i **P15-P20** zostały dodatkowo poddane badaniom przesiewowym na hamowanie wzrostu bakterii *S. aureus* i *E. coli*, ale wykazały niewielką aktywność. Z kolei badanie aktywności przeciwgrzybiczej dla połączenia kaspofunginy i **P12** dało pozytywny wynik, a wartość FIC = 0.28 wskazuje na wystąpienie synergii.

Poniżej nieliczne uwagi do tej części pracy, zgłoszone właściwie dla potwierdzenia dokładnego przeczytania tekstu:

- str. 54, ostateczne zdanie: Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny, otrzymując **S2**, a nie **S3**, z wydajnością 96%;

- str. 55, Tabela 15, pozycja 9: wartość 87 powinna odnosić się do wydajności, a nie mocy MW;
- str. 60: związek 2 otrzymano z wydajnością 78%, a nie 62%, czego dowodzi Schemat 7 oraz opis w części eksperymentalnej str. 104-105;
- str. 69, Rysunek 41: błędnie podano wzór związku **P12**.

Następny rozdział „Część eksperymentalna” zajmujący strony od 99 do 143 dokładnie dokumentuje przeprowadzone badania. Wszystkie eksperymenty zostały należycie opisane, a budowę wszystkich otrzymanych związków Autorka potwierdziła metodami spektroskopowymi, dla nowych pochodnych **P1-P20** zamieściła także wyniki analizy ESI MS. Analizy struktury otrzymanych związków nie budzą moich wątpliwości, niestety niekiedy nie podano temperatur topnienia i wartości skręcalności, a także porównania z wartościami literaturowymi dla znanych związków (ta uwaga nie dotyczy nowych pochodnych **P1-P20**, dla których zamieszczono pełną analizę). W opisie niektórych widm brakuje sygnału protonu/ów grupy hydroksylowej i aminowej. Zrozumiałym wydaje się brak takich sygnałów w widmach protonowych rejestrowanych w D₂O, CD₃OD czy DMSO-*d*₆, jednak dla widm rejestrowanych w CDCl₃, takie sygnały powinny być obecne. Za to dwa protony pochodzące od grup hydroksylowych znalazły się w opisie związku **23**, mimo że takowych nie ma w analizowanym związku, gdyż zostały zabezpieczone podstawnikami *t*-butylodimetylosililowymi.

Na zakończenie chciałabym jeszcze raz podkreślić bardzo dobre przygotowanie Doktorantki z zakresu technik magnetycznego rezonansu jądrowego, co pozwoliło w przekonujący sposób udowodnić struktury uzyskanych związków.

Przedstawione uwagi nie wpływają na końcową ocenę rozprawy. Cel pracy – synteza i ocena aktywności biologicznej pochodnych urydyny został zrealizowany pomyślnie. Autorka wykazała się niewątpliwie dobrym przygotowaniem merytorycznym, dużą starannością w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są wartościowe, posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w sześciu publikacjach naukowych. To bez wątpienia świadczy o dużym potencjale naukowym Autorki, za co była nagrodzona stypendium w ramach projektu *DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska* współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego. Autorka prowadziła także badania w ramach projektu *Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej*

wartości dodanej współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z póź. zm.). Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach o przyjęcie rozprawy doktorskiej mag inż. Katarzyny Ferenc i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w uznaniu dorobku naukowego i wartości pracy prosiłabym o rozważenie przez Wysoką Radę dołączonego do recenzji wniosku o wyróżnienie niniejszej pracy.

A. Lwisiński