

OCENA

pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Ferenc, pt.: „Synteza i ocena aktywności biologicznej pochodnych urydyny, jako potencjalnych inhibitorów syntazy chitynowej”, wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej, pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Ilony Wandzik, prof. Pol. Śl.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje część badań zrealizowanych w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w ramach projektu, pt.: „Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej”, współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, dotyczących poszukiwania nowych inhibitorów syntazy chitynowej w grupie pochodnych urydyny o potencjalnej aktywności przeciwgrzybiczej.

Wprowadzenie w ciągu ostatnich kilku dekad antybiotyków na dużą skalę ograniczyło w znacznym stopniu liczbę zakażeń bakteryjnych, ale jednocześnie przyczyniło się do znacznego wzrostu zachorowań spowodowanych przez różnego rodzaju grzyby. Pomimo intensywnych badań, w wielu ośrodkach na świecie, w dalszym ciągu w użyciu jest niewiele skutecznych leków w leczeniu infekcji grzybiczych. Stąd wybór tematyki pracy obejmującej zaprojektowanie, syntezę i ocenę aktywności biologicznej nowych związków, mogących znaleźć zastosowanie w terapii przeciwgrzybiczej, jest całkiem uzasadniony i zasługuje na uznanie oraz dobrze wpisuje się w dokonania zespołu prowadzonego przez Promotora, stanowiąc logiczną konsekwencję poprzednio zrealizowanych zadań badawczych w zakresie tej grupy aktywności biologicznej.

Postępując w sposób logiczny i konsekwentny Doktorantka w pierwszej kolejności zaprojektowała 20 związków, ukierunkowanych na analogii strukturalne urydynodifosforanu *N*-acetylo-D-glukozyaminy (UDP-GlcNAc)) i antybiotyków, takich jak: nikkomycyny i polioksyny, które są selektywnymi inhibitorami syntazy chitynowej, zawierających fragmenty o znanym i ukierunkowanym wpływie na właściwości farmakokinetyczne. W opinii recenzenta, kandydatka przedstawiła bardzo dobrze zaplanowany projekt, wraz z przekonującymi dowodami jego realizacji. Plan syntez od początku gwarantował

bezpieczeństwo wykonania, ograniczając ryzyko do otrzymania związków nieaktywnych. W pierwszym etapie badań Doktorantka zapewniła sobie dostęp do podstawowych substratów, oznaczonych w pracy jako S2-S5. Korzystając ze znanych w literaturze reakcji, a także wprowadzając własne modyfikacje syntetyczne i optymalizację procesów, uzyskała zaplanowane wyjściowe związki z wysokimi wydajnościami.

Przyjmując hipotezę występowania w syntazie chitynowej dwóch miejsc aktywnych Autorka przeprowadziła syntezę trzech tzw. dimerów, w cząsteczkach których dwie jednostki urydynylowe połączone są linkerami o charakterze amidowym, zawierającymi resztę bursztynylową lub dodatkowo jedną lub dwie jednostki glicylowe. Taka koncepcja konstrukcji łącznika pozwoliła na zróżnicowanie jego długości, jako jednego z istotnych parametrów determinującego aktywność oraz uzyskanie dimerów symetrycznych jak i niesymetrycznych, zdolnych do chelatowania jonów metali. Zaplanowane dimery Doktorantka otrzymała w reakcjach kondensacji według uproszczonej procedury z zastosowaniem bezwodnika bursztynowego, glicylowej pochodnej 5'-aminourydyny lub 5'-aminourydyny w trzech wariantach, zależnych od struktury końcowych produktów. Reakcje prowadziła w warunkach bezwodnych w obecności pochodnej fosfoniowej benzotriazolu (PyBOP) jako czynnika aktywującego grupy karbonylowe. Kontynuując ten kierunek badań Doktorantka w następnym etapie podjęła się syntezy monomerycznych pochodnych, które zawierają jedną resztę urydynylową i glicylową i/lub bursztynylową, co umożliwiło porównanie właściwości biologicznych z dimerami urydynylowymi. Jako substraty wykorzystowała 5'-aminourydynę zablokowaną w pozycjach 2' i 3' oraz jej glicylową pochodną. W tym przypadku reakcje kondensacji nie wymagały zastosowania czynnika kondensującego (PyBOP), a wykorzystanie w procesie odblokowania grup hydroksylowych TBAF lub AcCl pozwoliło na otrzymanie pochodnych kwasowych lub estrowych. Interesująca zdolność hamowania aktywności syntazy chitynowej dla amidoestru kwasu bursztynowego P12 stanowiła podstawę do rozszerzenia tego cyklu badań z zamiarem otrzymania pochodnych posiadających różne grupy estrowe. W tym celu Doktorantka otrzymała odpowiednie monoestry kwasu bursztynowego w oparciu o metody znane w literaturze i własne modyfikacje. Optymalizacja procesu estryfikacji i dopracowanie sposobu oczyszczania produktów pozwoliła na wybór strategii syntezy z użyciem niezablokowanej 5'-aminourydyny i odpowiednich monoestrów kwasu bursztynowego. Taki sposób działania pozwolił uprościć proces syntezy poprzez pominięcie etapu deprotekcji pozycji 2' i 3', co wiązało się z obniżeniem wydajności reakcji w porównaniu z zastosowaniem zablokowanej 5'-aminourydyny.

W dalszej części badań mgr inż. Katarzyna Ferenc dokonała syntezy analogu naturalnego substratu syntazy chitynowej, jakim jest urydynodifosforan *N*-acetylo-D-glukoaminy (UDP-GlcNAc), zastępując linker difosforanowy i resztę cukrową odpowiednio fragmentem glicylowym i cykloheksylowym, w ten sposób uzyskując układ o podobnej strukturze, zdolności do chelatowania jonów metali i większej lipofilowości.

Biorąc pod uwagę metalozależność syntazy chitynowej Doktorantka w dalszej części syntetycznej otrzymała pochodne urydyny z ugrupowaniem hydrazonowym jako linkerem w oparciu o reakcję aldehydu 2',3'-*O*-izopropylidenourydyny z hydrazdami o charakterze hydrofobowym. Analiza spektroskopowa NMR wykazała występowanie produktów w postaci mieszaniny izomerów geometrycznych i konformerów rotacyjnych. Rozszerzeniem tego kierunku badań była synteza dwóch pochodnych (P4, P5) zawierających resztę aldehydu salicylowego, jako drugiego elementu strukturalnego zwiększającego zdolność do chelatowania jonów metali.

Budowę związków Doktorantka wyczerpująco udokumentowała w oparciu o spektroskopię ^1H , ^{13}C NMR oraz spektrometrię masową. Umiejętnie stosowała metody chromatograficzne w monitorowaniu przebiegu reakcji oraz wyodrębnianiu i oczyszczaniu końcowych związków. Należy podkreślić, że w sumie otrzymała 20 zaplanowanych, nowych pochodnych urydyny. W tym względzie należy wysoko ocenić uzyskane przez mgr inż. Katarzynę Ferenc rezultaty, która realizując ogromny zakres badań laboratoryjnych, biorąc pod uwagę wielokierunkowy i wieloetapowy przebieg badanych procesów, założony cel badań syntetycznych osiągnęła.

Istotnym elementem pracy jest ocena działania biologicznego otrzymanych związków obejmująca hamowanie aktywności syntazy chitynowej, aktywności przeciwgrzybiczej, przeciwbakteryjnej i synergizmu. Pierwszy typ aktywności oznaczono wobec syntazy chitynowej wyizolowanej z drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* metodą wykorzystującą powinowactwo chityny do lektyny WGA (aglutynina kielków pszenicy). Spośród przebadanych związków tylko dwa monomer P12 (bardziej aktywny) i dimer P9 wykazują znaczące działanie hamowania aktywności tego enzymu. Istotną okazała się obserwacja dotycząca dimerów, z której wynika że nie wykazują one oczekiwanej aktywności biologicznej, w odróżnieniu od wyników prac zespołu Finneya i Yeagera. Ocenę aktywności przeciwgrzybiczej przeprowadzono wobec 8 szczepów we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, stosując jako związek referencyjny znany lek przeciwgrzybiczy flukonazol. Związkiem najbardziej aktywnym wobec wszystkich szczepów był monomer P12, który wykazał również działanie synergistyczne z kaspofunginą

wobec grzybów z gatunku *Candida albicans*. Najlepsze działanie wobec bakterii *E. coli* posiadał związek P6.

Rozprawa podzielona jest na 6 rozdziałów (w sumie 149 str.) i stanowi zwartą logiczną całość, należycie zilustrowaną wzorami chemicznymi oraz zawiera 56 rysunków, 22 schematy i 34 tabele.

Na wstępie Doktorantka przedstawiła cel i zakres pracy obejmujący projektowanie i syntezę nowych pochodnych urydyny o spodziewanym działaniu przeciwgrzybiczym, ich analizę spektroskopową oraz ocenę aktywności biologicznej.

Opis własnych dokonań Autorka poprzedza obszernym wstępem wprowadzającym w realizowaną tematykę, w zakresie postępów badań nad preparatami przeciwgrzybiczymi, syntazą chitynową i jej inhibitorami zarówno pochodzenia naturalnego jak i syntetycznego. Oceniając część teoretyczną należy stwierdzić, że jest ona napisana poprawnie, a zawarte w niej wiadomości są przydatne w czytaniu dalszych części dysertacji i stanowią odpowiednie uzasadnienie przeprowadzonych badań.

W części zatytułowanej *Omówienie wyników* (48 stron), podzielonej na pięć podrozdziałów, Autorka opisała zasady projektowania zaplanowanych struktur, wyniki badań syntetycznych, jak i zdolność hamowania syntazy chitynowej, ocenę aktywności przeciwgrzybiczej otrzymanych pochodnych urydyny. Na uwagę zasługuje umiejętność swobodnego poruszania się w tematyce związanej z badaniami strukturalnymi otrzymanych produktów, umiejętną interpretacją otrzymanych wyników i problemami mechanizmu reakcji chemicznych.

Następny rozdział *Podsumowanie i wnioski* w opinii recenzenta nie zawiera wyraźnie sformułowanych wniosków.

Obszerny rozdział *Część eksperymentalna* (45 stron) ujmuje szczegółowe opisy stosowanych metod, preparatykę, dane fizykochemiczne i spektroskopowe oraz badania aktywności biologicznej. Należy podkreślić, że zakres i sposób realizacji części eksperymentalnej, odnośnie rozwiązywania trudnych problemów syntetycznych, budzi uznanie i zasługuje na wysoką ocenę.

Rozprawę zamyka rozdział *Literatura* (208 pozycji), w znacznym stopniu uwzględniający publikacje oryginalne, podręczniki i opracowania przeglądowe. W tym zestawieniu większość pozycji pochodzi z ostatniej dekady, co dobrze świadczy o aktualności piśmiennictwa.

Uwagi jakie nasuwają się po przeczytaniu pracy mają głównie charakter redakcyjny. Uchybienia te dotyczą następujących zagadnień: na stronie 54 w ostatnim wierszu od dołu

powinno być S2 zamiast S3; na stronie 62, drugi wiersz od dołu zamiast 4 powinno być 5, a zamiast 5 powinno być 4; wydajności syntezy związków P7 i P9 podane na stronie 64 (Schemat 10 i na końcu tej strony) nie odpowiadają wartościom podanym na stronach 113-114; na stronie 67 w 7 wierszu od dołu powinno być P11-P14 zamiast P10-P14; wzory związków P13 i P14 na Schemacie 12 są odwrócone w odniesieniu do narysowanych na stronie 53; na Schemacie 17 podstawniki R powinny być bez O. Doktorantka pisze na stronie 86 „otrzymano produkt 31”, natomiast brak jest opisu syntezy w części eksperymentalnej; na stronie 94 powyżej Tabeli 24 powinno być „znacznie niższa niż wartości MIC dla pochodnej 12”. Pomimo, że Doktorantka podaje w Tabeli 25 dane dotyczące aktywności przeciwbakteryjnej to nie znalazłem opisu przebiegu oznaczeń w części eksperymentalnej. Dla wielu związków brak jest oznaczonych i literaturowych temperatur topnienia, nie wszystkie związki posiadają opisy widm ^{13}C i MS. Można zauważyć brak konsekwencji w podawaniu wartości skręcalności właściwej. Na stronie 109 podane są dane spektroskopowe związku 6 bez podania procedury jego otrzymania. Recenzent sugeruje podanie pełnych nazw związków 6, 7, 8, 11, 10, P9, P8, P7, 22, P1, P2, P3, P4, 32, P5. W spisie piśmiennictwa zdarzają się niekonsekwencje odnośnie skrótów czasopism, np. poz.: 98, 118, 122, 147, 168, 193, 194, 199, 204.

Przedstawione w mojej ocenie uwagi krytyczne, najczęściej o charakterze czysto technicznym, czy porządkującym nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Jest ona oparta na dostatecznym materiale doświadczalnym i odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Potwierdza ona również wysokie kwalifikacje Doktorantki, Jej kompetencje i zdolności eksperymentatorskie oraz wiedzę teoretyczną na poziomie odpowiadającym ósmemu poziomowi kompetencji według Europejskich Ram Kwalifikacji w dyscyplinie nauk chemicznych. Biorąc pod uwagę umiejętnie postawiony cel badawczy, wysoki stopień trudności zaplanowanych do rozwiązania zagadnień i ich znaczenie w procesie poszukiwania nowych leków o działaniu przeciwgrzybiczym, a także opublikowanie części uzyskanych wyników w renomowanych czasopismach naukowych, udział w realizacji projektu badawczego oraz uzyskanie stypendium DoktorRIS, wnoszę do Szanownego Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Ferenc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. farm. Stanisław Boryczka