prof. dr hab. Zbigniew Czarnocki
Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Warszawa, 14 maja 2012

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Krystiana Pyty, zatytułowanej „Synteza i struktura nowych aminowych analogów ansamycynowego antybiotyku rifampicyny"

Obserwowany w ostatnich dziesięcioleciach dynamiczny rozwój chemii organicznej w aspekcie zarówno nowych, efektywnych metodologii syntetycznych, jak i złożoności strukturalnej związków docelowych wydaje się być wynikiem nie tylko samoistnej ewolucji dziedziny, ale jest w dużym stopniu stymulowany zapotrzebowaniem różnorodnych innych obszarów nauki i techniki na nowe połączenia i materiały. Synteza organiczna coraz częściej staje się partnerem dla tak wydawałoby się odległych dziedzin, jak biologia molekularna, fizykochemia nowych materiałów, czy badania strukturalne, by wspomnieć jedynie o wybranych przykładach. Działalność w ramach projektów interdyscyplinarnych nakłada na zespoły realizujące, specjalizujące się w chemii organicznej, bardzo wysokie standardy, nie tylko warsztatowe, lecz przede wszystkim merytoryczne, wymuszając konieczność dysponowania szeroką wiedzą ogólną dotyczącą dziedzin pokrewnych. Efektywna zatem praca badawcza w obszarach interdyscyplinarnych realizowana być winna przede wszystkim w zespołach dysponujących kadrą o odpowiednio wysokim poziomie przygotowania merytorycznego i doświadczeniu w rozwiązywaniu problemów z różnorodnych dziedzin nauk przyrodniczych, fizykochemii i chemii medycznej.

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pana mgr Krystiana Pyty, poświęcona syntezie i badaniom strukturalnym pochodnych aminowych antybiotyku rifampicyny, pochodzi właśnie z takiego ośrodka, a osoba promotora pracy, Pana Dr hab. Piotra Przybylskiego stanowi rękojmię wysokiego poziomu naukowego dysertacji.

Pod względem formalnym praca ma klasyczny układ treści. Zawarta jest na 163 stronach maszynopisu, przy czym na Przegląd Literaturowy przypada 56 stron, zaś na część Badań Własnych blisko 100, wliczając w to 10 stron procedur syntetycznych i opisu danych analiz fizykochemicznych. Rozprawę kończy wykaz 248 pozycji literatury cytowanej, rozpoczyna zaś zwięzły, lecz bardzo jasno i interesująco napisany wstęp, zarysowujący cel i założenia pracy. We wstępie tym Doktorant zarysował historię odkrycia antybiotyków ansamycynowych, w tym rifamycyny, a także obszernie omówił ich cechy strukturalne. Po krótkiej prezentacji biosyntezy rifamycyn, przeszedł Autor do dyskusji zagadnień ściśle syntetycznych, koncentrując się na syntezach totalnych w tej grupie związków, przytaczając fundamentalne podejścia do tego

niezwykle trudnego zagadnienia realizowane przez grupy badawcze Coreya, Kishiego i Hanessiana. Dyskutowane kolejno transformacje rimfamycyn do rimfapicyny i jej analogów, cennych pochodnych o znacznie zwiększonym spektrum aktywności biologicznej, poszerzone są o dyskusję mechanizmu ich działania. Podnosi to, w mojej opinii, wartość merytoryczną rozprawy, albowiem pozwala na lepsze zrozumienie celowości zmian strukturalnych w poszukiwaniu kolejnych pochodnych syntetycznych antybiotyków ansamycynowych.

Następujący kolejno obszerny rozdział dotyczący tautomerii dobrze przygotowuje do dyskusji o roli tego zjawiska wśród szeroko pojętej klasy związków naturalnych. Podobną rolę grają, jak sądzę, rozdziały dotyczące zwitterjonów i procesów aminowania redukcyjnego, przy czym ten ostatni rozdział potraktowany został ze względu na istotne znaczenie w rozprawie, gruntownie i wyczerpująco. Zwraca uwagę staranność dyskusji, zarówno w kontekście pełnego omówienia dostępnych metod syntetycznych, jak też precyzyjnego doboru przykładów ilustrujących dostępne możliwości syntetyczne i ich ograniczenia.

Obszerny rozdział Badań Własnych Doktoranta otwiera opis prac syntetycznych zmierzających do otrzymania kluczowych substratów do właściwych badań. I tak, omówione są kolejno optymalizacje hydrolizy ugrupowania hydrazynowego rifampicyny oraz serie redukcyjnych alkilowań otrzymanego aldehydu prowadzące do otrzymania imponującego zestawu osiemnastu pochodnych, których stopień skomplikowania strukturalnego (z uwagi na obecność wrażliwego ugrupowania pochodzącego od rimfapicyny) nakładał na eksperymentatora wysokie wymagania warsztatowe. Z niezrozumiałych dla mnie względów opis tych prac prowadzony jest konsekwentnie w formie bezosobowej, choć z kontekstu dysertacji wynika jednoznaczne autorstwo Doktoranta. Ta sama uwaga dotyczy także opisów preparatywnych, umieszczonych w dalszej części rozprawy.

Wszystkie otrzymane związki poddane zostały następnie wnikliwym studiom spektroskopowym, czego obszerny opis wypełnia istotny fragment recenzowanego dzieła. Zgromadzenie kompletnych danych rezonansowych (protonowych, węglowych i azotowych), a także analiza złożonych eksperymentów korelacyjnych umożliwiło wykonanie precyzyjnego przypisania poszczególnych sygnałów, co znów z uwagi na stopień skomplikowania strukturalnego było dużym wyzwaniem badawczym i czego pomyślna realizacja wydatnie podnosi wartość merytoryczną dysertacji. Za bardzo ciekawą uważam dyskusję miejsc protonowania i odpowiednio deprotonowania cząsteczki, a także studia nad jej konformacją i stereochemią, co w odniesieniu do tzw. mostka ansamycynowego ma kluczowe znaczenie dla czynności biologicznej związku. W analizie złożonych widm rezonansowych wydatną pomoc uzyskano dzięki symulacjom komputerowym, które zastosowane tu zostały trafnie i efektywnie.

Cenne informacje strukturalne pozyskane zostały także dzięki równoległemu z wykorzystaniem widm węglowego rezonansu magnetycznego, zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni. Dzięki temu możliwa była dyskusja o wpływie gęstości elektronowej na wybranych atomach węgla na moc i wynikające z niej przesunięcia pasm absorpcji odpowiednich wiązań węgiel-tlen. Zaprezentowane w dysertacji rozumowanie wydaje się być całkowicie poprawne i dzięki temu wnioski mają, w mojej opinii, mocne uzasadnienie merytoryczne, choć z drugiej strony korelacja struktur typu zwitterjonowego ze strukturami fenolanowymi, zależnie od pH i rodzaju rozpuszczalnika była po części intuicyjna i możliwa do przewidzenia. Tym niemniej jednak zauważone korelacje mają wysoką wartość dowodową i dobrze wpisują się w prowadzoną dyskusję. Wartość rozstrzygającą posiadają natomiast wyniki rentgenowskiej analizy strukturalnej, którą udało się szczęśliwie wykonać w kilku przypadkach. Zastosowanie także spektrometrii mas (MALDI ToF) dodało omawianej dysertacji cechy uniwersalności nie tylko z uwagi na oryginalne, ciekawe wnioski, jakie wysnuć można było z analizy rozpadów poszczególnych fragmentów cząsteczki (wariant MS/MS), ale też udowodniło możliwość wykorzystania tej techniki w obszarze bardzo niskich stężeń badanych substancji, co jest czasem niezmiernie istotne w pracy ze związkami o znaczeniu farmakologicznym.

Zwieńczeniem pracy były niewątpliwie testy czynności biologicznej otrzymanych pochodnych. Wyniki zapewne nieco rozczarowały Autora, albowiem uzyskane aktywności oscylowały wokół stężeń mikromolowych (przy nanomolowych wartościach dla wzorcowej rifampicyny), jednak są to rezultaty w sumie bardzo dobre, porównywane z aktywnością innych silnych antybiotyków.

Dysertację kończy bardzo ciekawa dyskusja uzyskanych wyników w świetle współczesnej wiedzy o mechanizmie oddziaływania cząsteczki rimfapicyny z polimerazą RNA, co wydaje się kluczowe dla zrozumienia relacji struktura-aktywność w tego typu antybiotykach. Rozważaniami w tym rozdziale dowodzi Autor dobrego rozeznania we współczesnych zagadnieniach chemii bioorganicznej i umiejętności wiązania różnorodnych wątków w spójny model teoretyczny. Za szczególnie cenne uważam wyniki skrupulatnych badań spektroskopowych w odniesieniu do problemu struktury form tautomerycznych zredukowanej w obrębie ugrupowania hydrazonowego rifampicyny w zależności od rozpuszczalnika i powiązanie ich ze stopniem aktywności biologicznej tak otrzymanego związku. Rezultaty te doczekały się opublikowania w doskonałym czasopiśmie z dziedziny chemii bioorganicznej. Jest to jedna z zaiste imponującego zestawu siedemnastu publikacji, których współautorem jest mgr Pyta, co dobitnie dowodzi Jego ożywionej i efektywnej aktywności naukowej. Eleganckim podsumowaniem tej aktywności jest recenzowana dysertacja, którą jednoznacznie uznać można za wartościową i interesującą. Ta obszerna praca pozostawia na czytającym bardzo pozytywne

wrażenie zarówno kompetencji Autora, jak i wartości uzyskanych wyników, z których wiele wnosi istotny wkład do chemii ważnej grupy związków naturalnych o znaczeniu farmakologicznym.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem jednak wymienić kilka drobnych nieścisłości i przeoczeń, które oczywiście nie wpływają na pozytywną ocenę pracy, lecz jedynie mają na celu ich eliminację w przyszłych opracowaniach. I tak, na rysunku 2.7 (str. 7) zbędna jest stereochemia na ostatnim wzorze. Z kolei, na stronie 16, na rys. 2.13, uwagę recenzenta zwróciła nazwa „sól Fermiego", która powinna się jednak nazywać solą Frémy'ego (nitrozodisulfonian sodu lub potasu – utleniacz fenoli w reakcji Teubera). Rysunek 4.3 na stronie 43 zawiera kilka błędów literowych (wzór wody w reakcji a, temperatura w reakcji b), natomiast na stronie 44 pojawia się tajemniczy termin „rozpuszczalne źródło anionu wodorkowego". Na stronie 47 pojawia się informacja o tworzeniu się *N*-etyloindoliny w procesie redukcji z użyciem acetoksyborowodorku sodu, czego jednak nie potwierdza zamieszczony zaraz potem schemat. Drobnym przeoczeniem jest też nazwanie antydepresyjnego leku aptazepiny – aptazepinem, a także błędna pisownia mojego nazwiska (str. 59).

Jak już jednak wspomniałem, wymienione wyżej drobne uwagi w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny dysertacji, która spełnia w mojej opinii, wszelkie kryteria ustawowe, ilościowe i jakościowe, stawiane rozprawom doktorskim i z pełnym przekonaniem składam do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę obfity i wartościowy materiał eksperymentalny zgromadzony przez Doktoranta, a także doskonale przeprowadzoną jego dyskusję i prezentację, a w szczególności za odkrycie i zbadanie korelacji aktywności antybakteryjnej rifampicyny w kontekście wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia wodoru, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Zbigniew Czarnocki