

Dr hab. inż. Zbigniew Rozwadowski
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorski Uniwersytet
Technologiczny w Szczecinie

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Katarzyny Klich

pt. „Funkcjonalizacja aglikonu Spiramycyny przez zastosowanie regio- i stereo selektywnych reakcji kaskadowych”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Przybylskiego, prof. UAM w Zakładzie Syntezy i Struktury Związków Organicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Wyizolowanie przez Fleminga, Floreya i Chaina penicyliny jako pierwszego antybiotyku zapoczątkowało nową erę w medycynie i umożliwiło leczenie wielu chorób powodowanych przez zakażenia bakteryjne, które były dotąd nieuleczalne. Jednak upowszechnienie i nadmierne zużycie antybiotyków spowodowało, że w ostatnich latach powstają szczepy bakterii opornych na najczęściej stosowane antybiotyki. Jednym z celów przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Katarzyny Klich wykonanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Przybylskiego, prof. UAM oraz dr Krystiana Pyty jak promotora pomocniczego była funkcjonalizacja aglikonu spiramycyny, antybiotyku z grupy makrolidów stosowanego między innymi w leczeniu toksoplazmozy oraz ustalenie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością antybakteryjną i antynowotworową otrzymanych pochodnych, co doskonale wpisuje się w obecny nurt badań nad modyfikacjami antybiotyków i poszukiwaniem nowych związków o aktywności biologicznej. Zainteresowanie spiramycyną mierzone tylko ilością informacji dostępnych w literaturze potwierdza poprawność wyboru tematyki pracy

doktorskiej. Według bazy SciFinder w tym roku ukazało się już prawie 30 publikacji dotyczących spiramycyny, a od początku XXI wieku opublikowano ich około 4000. Również zastosowanie reakcji kaskadowych w syntezie opisanych pochodnych wpisuje się w zasady tak zwanej „zielonej chemii” oraz „chemii click”.

Praca doktorska liczy 221 stron, 8 tabel, 48 schematów oraz 68 rysunki. Łącznie cytowanych jest 126 pozycji literaturowych z których około 50% ukazała się w ostatnim 15-leciu, w tym około 10% w ostatnich 5-ciu latach. Dysertacja została podzielona na dziesięć rozdziałów obejmujących: cel pracy, część literaturową, omówienie i dyskusję wyników, część eksperymentalną, podsumowanie oraz bibliografię. Na początku rozprawy umieszczono spis stosowanych skrótów i symboli, a na jej końcu streszczenie w języku angielskim. Do pracy został dołączony załącznik na którym przedstawiono wzory wszystkich otrzymywanych i badanych związków wraz z numeracją odpowiednich pozycji, który bardzo ułatwia czytelnikowi śledzenie toku myślenia Doktorantki i nie wymusza ciągłego powracania do miejsc, w których po raz pierwszy zostały zaprezentowane omawiane struktury.

Część literaturowa została podzielona na sześć rozdziałów. W pierwszym Doktorantka przedstawiła informacje na temat spiramycyny jako antybiotyku makrolidowego, metod jej otrzymywania, mechanizmu działania oraz modyfikacji spiramycyny i aktywności biologicznej jej pochodnych. W kolejnym omówiono metody zamykania dużych pierścieni laktonowych, filozofię „chemii click” i jej zastosowanie w poszukiwaniu nowych leków. Następnie scharakteryzowano dipolarną cykloaddycję Huisgen’a katalizowaną jonami miedzi(I) jako mieszczącą się w nurcie „chemii click”, jej mechanizm oraz zastosowanie w syntezie związków o znaczeniu biologicznym. W ostatnim rozdziale tej części krótko omówiono znane typy reakcji kaskadowych wraz pojedynczymi przykładami. Proporcja części literaturowej do części poświęconej omówieniu i dyskusji wyników jest prawidłowa, układ dysertacji w tej części jest logiczny i zrozumiały. Zaprezentowane zagadnienia są trafnie dobrane i ciekawie wprowadzają czytelnika w omówienie i dyskusję wyników oraz świadczą o dobrej znajomości przez Doktorantkę problematyki badawczej, którą się zajmuje.

Omówienie literatury jest związane i związane z tematem pracy, jednak Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędów stylistycznych, interpunkcyjnych, pewnej niekonsekwencji w pisowni czy też stosowanych skrótów. Na przykład na str. 8 na schemacie 3 jest błąd w numeracji związków (zamiast 4 powinien być 3), zdanie na

stronie 12 jest wielokrotnie złożone i traci sens, na stronie 19, w punkcie 3 brakuje litery „i” w słowie inhibicja, w spisie stosowanych skrótów brakuje tego z rysunku 8 (Fmoc), z rysunku 10 (Cy) czy ze strony 32 (TGS), str. 44 zastosowano skrót myślowy „kinetyka jest stosunkowo niska”, str. 53 niekonsekwencja w pisowni nazwy Dielsa-Aldera, str. 42 zamiast kwasu hydrowodorowego powinno być azotowodorowego czy triazoli zamiast tirazoli (strona 43). Wydaje mi się, że Doktorantka trochę zbyt słabo wyeksponowała w części literaturowej mechanizm działania spiramycyny, chociaż rozumiem, że wpłynęłoby to na zwiększenie objętości i tak już obszernej pracy. Moim zdaniem również zbyt „gwałtowne” jest przejście z części literaturowej do omówienia wyników-w tym miejscu kilka słów wstępu i przypomnienie celów pracy złagodziłoby to wrażenie.

Główną częścią przedstawionej pracy doktorskiej jest omówienie i dyskusja wyników, obszerna ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz szczegółowe opisy uzyskanych wyników. W kolejnych punktach tej części Doktorantka opisuje etapy syntezy nienasyconego aglikonu spiramycyny, a następnie jego modyfikacji poprzez reakcję addycji typu Michaela i kolejno reakcję cykloaddycji Huisgena. Mgr Katarzyna Klich w trakcie realizacji pracy doktorskiej otrzymała na drodze wieloetapowych syntez 23 nowe pochodne spiramycyny, które zostały w pełni scharakteryzowane. Bardzo szczegółowa i dogłębna analiza widm ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^{13}C HSQC, NOESY a także widm FT-IR czy ESI MS umożliwiła nie tylko identyfikację otrzymanych pochodnych, ale przede wszystkim na określenie tak istotnej z punktu widzenia związków biologicznie aktywnych ich stereochemii i konformacji. Połączenie danych z widm NMR ze strukturami obliczonymi przy użyciu metody DFT pozwoliło również na zaproponowanie mechanizmu kaskadowych reakcji eliminacji typu E1cB czy też addycji typu Michaela. Doktorantka w bardzo czytelny i przemyślany sposób przedstawia analizę danych spektroskopowych na każdym etapie syntezy. Tak szczegółowa analiza widm NMR, także w połączeniu z innymi technikami spektroskopowymi czy obliczeniami teoretycznymi, wyciągane w oparciu o te wyniki wnioski, próby wyjaśnianie kierunku przebiegu reakcji świadczą o dużym doświadczeniu i biegłości w pracy z różnymi technikami badawczymi oraz umiejętności Doktorantki w samodzielnym prowadzeniu i planowaniu badań. O wartości tych wyników świadczy również ich publikacja w Journal of Organic Chemistry (IF=4,76).

W rozdziale VII mgr Katarzyna Klich podjęła się próby oceny właściwości antybakteryjnych i antynowotworowych otrzymanych przez siebie pochodnych spiramycyny. Badania aktywności przeciwbakteryjnej prowadzone były dla siedmiu szczepów bakterii m.in. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* czy *Streptococcus pneumoniae*. W oparciu o obliczone modele dokowania spiramycyny i jej dwóch pochodnych w tunelu rybosomalnym podjednostki 50S komórki bakteryjnej *H. marismortui* Doktorantka podjęła się trudnej próby wyjaśnienia różnic we właściwościach przeciwbakteryjnych pochodnych. Tylko jedna z otrzymanych pochodnych wykazywała zbliżoną do spiramycyny aktywność antybakteryjną, była jednak dużo lepiej rozpuszczalna w wodzie. Obliczone metodą semiempiryczną MOG-PM6 z algorytmem do modelowania dużych molekuł modele wykazały na istotne różnice w dokowaniu spiramycyny i jej pochodnych w tunelu rybosomalnym takie jak między innymi różne długości tworzących się wiązań wodorowych czy oddziaływań pomiędzy cząsteczką makrolidu a otoczeniem tunelu rybosomalnego. W przypadku aktywnej pochodnej zawierającej w strukturze cząsteczki podstawnik cukrowy z grupą N-acetylową, model dokowania dowodzi, że inne typy oddziaływań mogą kompensować brak możliwości wytworzenia odwracalnego wiązania kowalencyjnego pomiędzy makrolidem a rybosomom, a który jest ściśle związany z wysoką aktywnością przeciwbakteryjną spiramycyny.

Bardzo interesujące były wyniki badania aktywności antynowotworowej spiramycyny i wybranych jej pochodnych na linie komórkowe raka szyki macicy (HeLa), nosogardzieli (KB), piersi (MCF-7), wątroby (HepG2) i glejaka (U87). Doktorantka wykazała, że wpływ na aktywność antynowotworową ma objętość podstawnika hydrofobowego przyłączonego do pierścienia triazolowego. Za szczególnie ważne uważam informacje nie tylko o większej niż w przypadku samej spiramycyny aktywności antynowotworowej badanych pochodnych, ale przede wszystkim że współczynnik selektywności dla najbardziej aktywnej pochodnej z podstawnikiem cykloheptylowym mieścił się w granicach od 1,24 do 1,78. Może to stanowić punkt wyjścia do poszukiwania nowych, efektywnych terapii antynowotworowych w tej grupie związków.

Doktorantka udowodniła, że potrafi prawidłowo zaplanować wieloetapową syntezę, wnikliwie oceniać wyniki i wyciągać na ich podstawie poprawne wnioski. Jestem pod dużym wrażeniem materiału zebranego w ocenianej dysertacji i szerokiego

zakresu badań-od zaplanowania i przeprowadzenia syntezy pochodnych zawierających aglikon spiramycyny, ich identyfikacji, zaproponowania mechanizmu reakcji, do przeprowadzenia badań biologicznych i w oparciu o model dokowania wyjaśnienie aktywności biologicznej.

Za najważniejsze osiągnięcia naukowe dysertacji uważam:

- Ustalenie struktury 23 nowootrzymanyh na drodze wieloetapowej syntezy analogów spiramycyny w oparciu o bardzo szczegółową analizę widm NMR
- Zaproponowanie mechanizmów reakcji kaskadowych prowadzącej do powstania zmodyfikowanego aglikonu spiramycyny
- Ustalenie zależności pomiędzy aktywnością biologiczną (właściwości antybakteryjne), a strukturą otrzymanych pochodnych

Doktorantka w bardzo klarowny i logiczny sposób prezentuje wyniki swoich badań oraz wyciąga prawidłowe wnioski. Wszystkie dane NMR zostały zebrane w 4 olbrzymie tabele, które zajmują 21 stron. Rozumiem założenie Doktorantki, która chciała w ten sposób zebrać wszystkie wyniki w jednym miejscu, ale już samo ułożenie poszczególnych stron tabel (odbicia lustrzane) utrudnia z niej korzystanie. W analizie danych spektroskopowych stosuje również pewne zwroty żargonowe czy też skróty myślowe. Na przykład „w stronę niższych wartości ppm” czy „w stronę niższego pola” zamiast bardziej poprawnego w stronę „niższych wartości przesunięcia chemicznego” i „w stronę niższego natężenia pola magnetycznego”. Podobnie jest w przypadku określenia „drżania rozciągające laktonu grupy aldehydowej”. Znalazłem również kilka błędów literowych na przykład na stronie 145 (Gly468 zamiast Gly4687) czy też nadmiarowe „przez” na stronie 157. Wydaje mi się, że umieszczenie widm NMR na samym końcu pracy jako aneksu wpłynęłoby na przejrzystość pracy.

W trakcie czytania pracy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań:

- Czy przypisania sygnałów rezonansowych w widmach ^1H i ^{13}C NMR spiramycyny w CD_3CN Doktorantka dokonywała w oparciu o dostępne dane literaturowe dla innych rozpuszczalników (np. *Pharmaceutical Research*, 11 (1994) 458)?
- W Tabeli 1 brakuje pozycji dla przesunięcia chemicznego protonu grupy hydroksylowej w pozycji 3 dla spiramycyny i jej pochodnych SPR1 i SPR2. Czy tak

jak w przypadku protonów grup hydroksylowych w pozycjach 2', 3''' i 4''' był on niewidoczny?

- W oparciu o analizę pasma w widmie FT IR w zakresie 1745-1702 cm^{-1} oraz obliczeń metodą DFT Doktoranta wykazała istnienie dwóch form spiramycyny, w których występują różne typy wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (strona 67), a które nie są widoczne w widmach NMR. Czy Doktorantka brała pod uwagę możliwość (względnie podjęła próbę) modyfikacji warunków rejestracji widma NMR, które mogłyby pozwolić na potwierdzenie wyników FT-IR (na przykład pomiary niskotemperaturowe)?
- Na stronie 144 opisane są oddziaływania wynikające z dokowania spiramycyny w tunelu rybosomalnym. Atom azotu grupy N,N-dimetylowej mykaminozy, atom tlenu wiązania glikozydowego spinającego mykaminozę i mykarozę oraz atom tlenu z grupy hydroksylowej w pozycji 5'' kompleksują kation magnezu. Jednak w pozycji 5'' nie ma grupy hydroksylowej, a w Tabeli 5 pokazane jest oddziaływanie pomiędzy tlenem w pozycji 1'', a nie 5''. Jaka jest przyczyna tej nieścisłości?
- Czy Doktorantka brała pod uwagę możliwość zbadania struktury chociaż części otrzymanych przez siebie pochodnych w cieple stałym?
- W części eksperymentalnej omówione są badania aktywności biologicznej. Niestety, nie ma informacji czy badania te zostały wykonane z udziałem Doktorantki czy też zlecone.
- Czy były jakieś specjalne kryteria wyboru otrzymanych pochodnych spiramycyny do badań aktywności antynowotworowej?

Wszystkie powyższe uwagi uczynione z obowiązku recenzenta w najmniejszym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionej dysertacji. Chciałbym podkreślić szeroki zakres prowadzonych badań, a także szczegółowość opisów i analizowania wyników, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu Doktorantki w prowadzone prace. Dysertacja pod względem graficznym i językowym przygotowana jest bardzo starannie, wspomniane przeze mnie pojedyncze błędy literowe, uwagi dotyczące układu pracy czy używane określenia w żaden sposób nie odbierają przyjemności w jej czytaniu. Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie merytoryczne i formalne wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i

tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym
wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o
dopuszczenie mgr Katarzyny Klich do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rowadowski