

RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Babijczuk

p.t.: Koniugaty indolowe – synteza, analiza strukturalna i ocena aktywności biologicznej

przygotowanej

na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

pod kierunkiem

prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz, Promotora

Poszukiwanie skutecznych terapii chorób cywilizacyjnych stanowi jeden z wiodących kierunków interdyscyplinarnych badań prowadzonych na pograniczu chemii, biologii, medycyny i farmacji. Wśród podejmowanych strategii szczególnie obiecującym nurtem jest projektowanie nowych leków o wielokierunkowym profilu działania. Od kilku dekad przedmiotem intensywnych badań jest identyfikacja i rozwój związków o właściwościach antyoksydacyjnych, które mogą stanowić podstawę opracowania skutecznych środków profilaktycznych i terapeutycznych w zwalczaniu schorzeń wywołanych stresem oksydacyjnym.

Szczególne znaczenie w tym kontekście przypisuje się związkom zawierającym pierścień indolowy – strukturalny element wielu naturalnych metabolitów, takich jak serotonina, melatonina, tryptofan czy winkrystyna. Właściwości chemiczne i biologiczne układu indolowego, między innymi zdolność do oddziaływań międzycząsteczkowych i modulowania aktywności enzymatycznej, czynią go atrakcyjnym w projektowaniu nowych bioaktywnych cząsteczek. Na tym tle koniugaty indolowe, czyli związki zawierające fragment strukturalny pierścienia indolowego połączonego z inną bioaktywną jednostką (np. peptydem, cukrem, alkaloidem, resztą lipofilową lub grupą farmakoforową), zyskują rosnące zainteresowanie. Jak wykazano w licznych badaniach cytowanych również w niniejszej dysertacji, dalszy rozwój badań nad koniugatami indolowymi – szczególnie ukierunkowany na optymalizację ich struktury i poprawę biodostępności – może znacząco przyczynić się do powstania nowej generacji leków o działaniu ochronnym i terapeutycznym, dedykowanych zwalczaniu chorób cywilizacyjnych.

Oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Babijczuk doskonale wpisuje się w ten nurt badań naukowych, ponieważ jej nadrzędnym celem była synteza i wytypowanie koniugatów indolowych wykazujących wysoką aktywność antyoksydacyjną, stanowiących potencjalną bazę do dalszych prac nad nowoczesnymi terapiami. Zagadnienia te są również integralną częścią innowacyjnych badań prowadzonych przez Panią Promotor, prof. UAM dr hab. Beatę Jasiewicz, dotyczących opracowania i modyfikacji nowych bioaktywnych struktur.



Oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Babijczuk została przygotowana w oparciu o cykl trzech publikacji naukowych (P1-P3) tej Autorki indeksowanych w bazach Scopus i WoS oraz jednego manuskryptu wysłanego do czasopisma (P4). W trzech z tych publikacji Doktorantka jest pierwszą autorką.

Zgodnie z przyjętymi zasadami, dysertacja przygotowana w wyżej podany sposób składa się z dwóch komplementarnych części: omówienia problematyki, a także wiodących wyników badań oraz pełnych tekstów publikacji stanowiących podstawę postępowania awansowego. Praca doktorska mgr Karoliny Babijczuk spełnia te warunki, co znalazło odzwierciedlenie w jej kompozycji. Rozprawa została przygotowana jako liczący 70 stron komentarz, który rozpoczyna *Życiorys naukowy* oraz dorobek Kandydatki. W tej części Autorka zaprezentowała listę publikacji naukowych, w której oprócz wspomnianych wcześniej publikacji wymieniła kolejne cztery (P5-P8, P8 – wysłana do wydawnictwa), współautorstwo w trzech rozdziałach w monografiach, a także uczestnictwo w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, podczas których prezentowała rezultaty swoich badań. Taki dorobek i aktywność naukowa Pani mgr Karoliny Babijczuk zdecydowanie zasługują na wyróżnienie. Doktorantka jest współautorką w sumie 6 oryginalnych publikacji naukowych ogłoszonych drukiem w latach 2022-2025 w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym IF= 24,50. Wszystkie prace, zgodnie z danymi zarejestrowanymi w bazie danych WoS były cytowane do tej pory 31 razy, co wskazuje na znaczenie uzyskanych wyników i podjętej tematyki.

W kolejnym rozdziale opracowania Pani mgr Karolina Babijczuk zawarła jednocześnie wstęp oraz cel pracy, którym jak wskazała była synteza koniugatów indolowych wykazujących właściwości antyoksydacyjne oraz analiza zależności struktura-aktywność biologiczna otrzymanych związków. Podczas lektury tej części odniosłam wrażenie, że stanowi ona równocześnie skrócone podsumowanie pracy, którego rozszerzoną wersję Autorka zredagowała na końcu opracowania. W moim przekonaniu należało w tej części opisać zadania i problemy badawcze, z którymi postanowiła zmierzyć się Doktorantka, aby osiągnąć założony cel.

Zasadniczą część rozważań stanowiącą uzasadnienie przeprowadzonych badań Autorka podzieliła na dwie części: *Część literaturowa* i *Wyniki badań*. W dalszej kolejności zawarła *Podsumowanie* potwierdzające osiągnięcia uzyskane podczas realizacji kolejnych zadań pracy doktorskiej, oraz zestawienie numeracji otrzymanych związków używane w niniejszym opracowaniu i w poszczególnych publikacjach naukowych. Podkreślę, że to rozwiązanie ogromnie pomogło mi w nawigowaniu i identyfikacji poszczególnych związków, podobnie jak staranna prezentacja schematów przeprowadzonych syntez.

Pierwsza, literaturowa część składa się z trzech rozdziałów: *Koniugaty*, *Indol*, *Gramina* i *Azole*, tekst których wprowadza czytelnika w obszar zainteresowań naukowych Kandydatki. Pani mgr Karolina Babijczuk w syntetyczny, a jednocześnie precyzyjny i wyczerpujący sposób zaprezentowała aktualną, bogatą wiedzę dotyczącą strategii opracowywania nowych leków w postaci biokoniugatów oraz związków hybrydowych. W ramach omawianego zagadnienia, szczegółowo scharakteryzowała układ indolowy, podała źródła jego występowania i przykłady alkaloidów indolowych, a także omówiła właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. W kolejnych rozważaniach ukazała graminę, jeden z alkaloidów indolowych jako popularny związek



wyjściowy w syntezie pochodnych o dużym potencjale właściwości terapeutycznych, w tym przeciwutleniających, przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych.

W następnym rozdziale Pani mgr Karolina Babijczuk scharakteryzowała heterocykliczne, pięciocłonowe azole: imidazol i pirazol, ukazując je jako związki wchodzące w skład struktury wielu leków o różnorodnym działaniu. Związki te znalazły zastosowanie między innymi w leczeniu jaskry, zaburzeń erekcji, niektórych nowotworów, a także jako środki przeciwzapalne, przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne.

Ten fragment rozprawy został przygotowany w sposób bardzo kompetentny, świadczący o dużej wiedzy Doktorantki. Tym bardziej, że omówione przykłady literaturowe zostały dobrane w sposób prawidłowy, dobrze przygotowując Czytelnika do lektury dalszej części dysertacji. Ponadto, chcę podkreślić, że śledzenie tej części pracy w dużym stopniu uatrakcyjniają przejrzyste i czytelne rysunki oraz schematy.

Druga, doświadczalna część opisu zawiera szczegółowe omówienie uzyskanych wyników w nawiązaniu do sformułowanego celu. Opis rezultatów swoich badań Doktorantka również podzieliła na kilka rozdziałów: *Synteza*, *Analiza spektroskopowa otrzymanych związków*, *Struktura w kryształach*, *Badania biologiczne*, które objęły aktywność hemolityczną, przeciwutleniającą, przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną oraz *Badania in silico*, omawiające właściwości fizykochemiczne otrzymanych pochodnych, a także dokowanie molekularne.

Treści zawarte w kolejnych rozdziałach opisujących wyniki badań w pełni odpowiadają dążeniu do osiągnięcia założonego celu, z uwzględnieniem całego zestawu zadań badawczych zrealizowanego przez Autorkę. W ramach realizacji ambitnego planu badawczego poszukiwania nowych bioaktywnych związków Pani mgr Karolina Babijczuk zaprojektowała i otrzymała 39 koniugatów indolowych, które podzieliła na trzy grupy: indolowo-imidazolowe, indolowo-azolowe z grupą tionową (tioketony) i indolowo-pirazolowe oraz 6 kompleksów z ligandami indolowo-imidazolowymi. Struktury związków potwierdziła dokonując czasochłonnych i wnikliwych analiz metodami spektroskopowymi (m.in. NMR, FT-IR, MS). Należy docenić duży wysiłek Doktorantki oraz ponadprzeciętną znajomość warsztatu laboratoryjnego, bowiem synteza i opracowanie struktury kilkudziesięciu pochodnych wymagały ogromnego zaangażowania i staranności.

Dla znacznej liczby nowo zsyntetyzowanych związków, we współpracy z Zakładem Krystalografii Wydziału Chemii UAM, wyznaczono struktury krystaliczne, co umożliwiło m.in. identyfikację innej formy tautomerycznej jednego z koniugatów i wyjaśnienie jego wysokiej aktywności hemolitycznej. Wyniki tych interesujących spostrzeżeń znalazły szersze rozwinięcie w postaci publikacji naukowej (P3), pt.: *Novel C3-Methylene-Bridged Indole Derivatives with and without Substituents at N1: The Influence of Substituents on Their Hemolytic, Cytoprotective, and Antimicrobial Activity*.

Ocena aktywności biologicznej stanowi kluczowy etap w procesie poszukiwania nowych substancji aktywnych. W ramach swoich badań mgr Karolina Babijczuk we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, przeprowadziła testy właściwości hemolitycznych, cytoprotekcyjnych oraz zdolności do chelatowania jonów metali nowo otrzymanych koniugatów i hybryd. Pozyskane rezultaty wskazały, iż większość badanych związków posiada zadowalające właściwości przeciwutleniające oraz dobrą hemokompatybilność.



Szczegółowa analiza zależności pomiędzy budową strukturalną otrzymanych pochodnych a ich aktywnością biologiczną pozwoliła Doktorantce na identyfikację elementów strukturalnych odpowiedzialnych za obserwowane właściwości. W świetle przeprowadzonych badań substancje te można zakwalifikować do dalszych etapów analitycznych i rozważać ich potencjalne zastosowanie w celach medycznych.

Kolejnym, nie mniej interesującym etapem badań zrealizowanym przez Panią mgr Karolinę Babijczuk we współpracy z pracownikami Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu była ocena aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej wybranych pochodnych. Testom aktywności przeciwbakteryjnej, z zastosowaniem metody dyfuzji studzienkowej, poddano zarówno otrzymane koniugaty, jak i kompleksy. Analiza rezultatów wykazała, że badane związki wykazują umiarkowaną aktywność wobec wytypowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*). Najwyższą aktywność wobec *M. luteus* i *E. coli* wykazały niektóre koniugaty indolowo-pirazolowe charakteryzujące się strefą zahamowania wzrostu nieznacznie >15 mm. Kontynuując badania aktywności biologicznej sprawdzono potencjał przeciwgrzybowy otrzymanych związków. Nieco zaskakujący dla mnie był dobór organizmów testowych, ponieważ do tej części badań wybrano szczepy grzybów odpowiedzialnych za choroby drewna oraz patogeny roślin. W kolejnych testach zbadano wpływ koniugatów indolowo-imidazolowych oraz dwóch koniugatów indolowo-tioketonowych na wzrost i rozwój szczepów grzybów nadrzewnych: *Coriolus versicolor*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* i *Gloeophyllum trabeum*. Oceniono także działanie wybranych koniugatów graminy z tioketonami oraz pochodnymi pirazolu na patogeny roślin: *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, a także na szczepy *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviride*, stosowane jako biologiczne fungicydy m.in. w uprawach warzywnych przeciw chorobom grzybowym. Nowo otrzymane związki wykazały obiecujący potencjał przeciwgrzybiczy, co otwiera perspektywę ich wykorzystania jako środków grzybobójczych.

Klamrę podsumowującą etap badań biologicznych stanowiła analiza ADME, którą Doktorantka przeprowadziła dla wybranych związków (2-40) i kompleksów (K2-K9), przy użyciu programu SwissADME. Analiza pozwoliła wyznaczyć parametry związane z właściwościami farmakokinetycznymi badanych pochodnych i określić ich przydatność jako potencjalnych leków. Otrzymane pochodne w większości spełniają reguły Lipinskiego i Veber'a, co wskazuje na duże prawdopodobieństwo ich dobrej biodostępności. Badania te wskazały także, że w większości zaprojektowane pochodne cechują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, dobrą wchłanianością z przewodu pokarmowego i zdolnością przekraczania bariery krew/mózg.

Koniugaty, drugiej i trzeciej grupy, które cechowały się wysoką aktywnością cytoprotekcyjną przekazano do badań dokowania molekularnego, które przeprowadzono w Zakładzie Chemii Kwantowej Wydziału Chemii UAM. Sprawdzone powinowactwo tych związków do trzech domen białkowych: mieloperoksydazy, dehydrogenazy ksantanowej i cyklooksygenazy-2. Wyniki wykazały, iż pochodne te mogą łączyć się z enzymami generującymi wolne rodniki.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że Doktorantka wykazała się niezwykle umiejętnością prowadzenia złożonych i wielokierunkowych badań, w tym współpracy z innymi osobami, co w efekcie pozwoliło na uzyskanie ważnych z naukowego punktu widzenia korelacji i spostrzeżeń.



Zwyczajowo, omówienie osiągnięć Doktorantki zamyka obszerny wykaz cytowanego piśmiennictwa zawierający 242 pozycje literatury, w ponad 50% upublicznionej w ostatnich pięciu latach. Wskazana dynamika jest kolejnym wyznacznikiem świadczącym o aktualności problematyki badawczej Pani mgr Karoliny Babijczuk. Ta część rozprawy została przygotowana z dużą dbałością i praktycznie nie zawiera błędów edytorskich; w kilku pozycjach zauważyłam brak roku wydania (24, 53, 59, 185). Po nim Autorka zamieściła bardzo krótkie streszczenie swojej rozprawy w języku polskim i angielskim.

Najobszerniejszą, a z punktu widzenia formalnego najistotniejszą częścią rozprawy są pełne teksty trzech publikacji będących podstawą przygotowania tego opracowania, dla których w każdym przypadku Autorka zachowała oryginalny format druku źródłowego czasopisma oraz tekst manuskryptu przesłanego do wydawnictwa. Załączyła także oświadczenia współautorów publikacji, których analiza wskazuje na znaczący wkład Doktorantki w ich powstanie. Jednakże w mojej opinii w oświadczeniach znalazły się pewne nieścisłości, które przedstawiam poniżej i proszę o wyjaśnienie:

- brak oświadczenia prof. UPP dr hab. Justyny Starzyk, współautorki prac P1-P4,
- brak oświadczenia prof. UPP dr hab. Grzegorza Cofty, współautora pracy P1,
- brak oświadczenia Yunna da Victoria Banda współautora pracy P4.

Z racji tego, iż publikacje te przeszły pełną procedurę recenzji i zostały zaakceptowane przez redakcje czasopism zgodnie z odrębnymi wymaganiami, omawianie kompozycji oraz formalnej struktury tych prac Recenzent uznaje za bezprzedmiotowe. Warto jednak podkreślić, że prace te zawierają wyniki tworzące oryginalne rozwiązania istotnych problemów naukowych, wnoszą znaczny i cenny naukowy wkład w rozwój nauk chemicznych oraz stanowią rozwinięcie i uzupełnienie zagadnień merytorycznych w odniesieniu do interpretacji wyników badań zawartych przez Doktorantkę w niniejszym opracowaniu. Wyniki badań mogą stanowić podstawę do dalszych prac nad nowymi związkami bioaktywnymi, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne leki.

Ponieważ do obowiązków Recenzenta należy także ocena rozprawy pod kątem spójności i jakości edycji treści, pragnę zauważyć, że w dysertacji znajdują się sformułowania, które wzbudziły moją wątpliwość. Proszę zatem Doktorantkę o wyjaśnienie:

- Str. 6 i inne, proszę o wyjaśnienie zamiennego stosowania pojęcia *przeciwwgrzybiczne* i *przeciwwgrzybicze* – str. 26 przedostatni akapit.
- Str. 8, podrozdział 1.2. *Związki hybrydowe*; proszę o zweryfikowanie pojęcia *antybiotykooodporność bakterii* i *lekoodporność nowotworów* (Str. 8, 13).
- Str. 46 i 49, nazwisko Chrisa A. Lipinskiego twórcy „reguły pięciu” w moim przekonaniu powinno być pisane z literą „n” a nie „ń”?

W trakcie lektury części opisowej rozprawy oraz publikacji naukowych nasunęły mi się również pytania, które przedstawiam do dyskusji i proszę Panią mgr Karlinę Babijczuk o komentarz:

- Czy wszystkie analizy metodami spektroskopowymi (NMR, FT-IR, MS) Doktorantka wykonała osobiście?



- Jakim kryterium kierowała się Doktorantka dobierając kierunek badań mikrobiologicznych? Dlaczego przeprowadzono badania aktywności przeciwgrzybiczej wyłącznie z zastosowaniem grzybów odpowiedzialnych za choroby drewna oraz patogenów roślin, a nie podjęto testów z użyciem patogenów ludzkich?

Przedstawiona do recenzji dysertacja została napisana poprawnym językiem. Opracowanie graficzne rozprawy zostało przygotowane w sposób bardzo staranny, a omawiane zagadnienia zostały uzupełnione przez odpowiednie schematy i tabele, co ułatwiło Recenzentowi logiczne śledzenie niektórych bardzo szczegółowych opisów. W trakcie edycji tekstu, Autorka nie uniknęła drobnych błędów gramatycznych i typograficznych (np. błędna numeracja rozdziałów). Jednakże te uchybienia nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną ocenę rozprawy, a zawarte w recenzji uwagi mają charakter formalny lub polemiczny.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Karolina Babiczuk zrealizowała zaplanowane działania naukowe i dzięki uzyskaniu rezultatów o odpowiedniej jakości, osiągnęła zamierzony cel badawczy. Recenzowaną rozprawę wyróżnia interesująca i spójna tematyka badawcza, a także wysoki poziom merytoryczny zrealizowanych badań. Uważam, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i wartościowe, czego jednym z dowodów jest ich upublicznienie w formie artykułów naukowych w czasopismach indeksowanych w światowych bazach abstraktowo-bibliometrycznych oraz w formie doniesień konferencyjnych.

Uznając zatem walory merytoryczne ocenianej dysertacji, jako spełniające formalne i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim oraz dorobek wdrożeniowy stwierdzam, że w moim przekonaniu niniejsza rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 pkt.1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), jak również warunki ujęte w art. 187, ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Wnoszę zatem do Wysockiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Babiczuk do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Izabela Janicki-Elis