



Wydział
Technologii i Inżynierii
Chemicznej

Szczecin 22.04.2025

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

Recenzja pracy doktorskiej

mgr Karoliny Babiczuk

pt. „ **Koniugaty indolowe – synteza, analiza strukturalna i ocena aktywności biologicznej**”

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Beaty Jasiewicz, prof. UAM w Zakładzie Produktów Bioaktywnych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Poszukiwanie nowych układów o potencjalnej aktywności biologicznej jest jednym z najważniejszych wyzwań jakie stoją przed współczesną nauką. W prasie codziennej i literaturze fachowej coraz częściej pojawiają się informacje o zakażeniach wywołanych szczepami bakterii czy grzybów odpornych na dotychczas stosowane w terapii leki, stąd synteza i badania aktywności biologicznej nowych układów, określenie wpływu poszczególnych elementów układu na tą aktywność czy strukturę cząsteczki może pomóc w rozwiązaniu tego problemu. Jednym z kierunków tego typu badań jest synteza związków będących hybrydami dwóch różnych aktywnych biologicznie (potencjalnie aktywnych) substancji i oczekiwane pojawienie się efektu synergii. W ten

nurt badań doskonale wpisuje się tematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Karoliny Babijczuk wykonanej pod kierunkiem dr hab. Beaty Jasiewicz, prof. UAM, poświęconej koniugatom indolowym.

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma formę zbioru czterech publikacji (z tego trzy opublikowane, czwarta wysłana do redakcji) powiązanych tematycznie, opatrzonych odpowiednim wstępem oraz omówieniem celu pracy i jej najważniejszych osiągnięć. Wszystkie publikacje naukowe są wieloautorskie. W trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, co potwierdza jej znaczącą rolę w powstaniu tych publikacji. Również dołączone oświadczenia współautorów świadczą o wiodącej roli Doktorantki w opisanych badaniach i powstaniu manuskryptów. Należy w tym miejscu wspomnieć, że wspomniane publikacje nie są jedynymi w dorobku naukowym Doktorantki – łącznie jest współautorką 8 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W autoreferacie liczącym 70 stron w przystępny sposób została przedstawiona tematyka poruszana w publikacjach naukowych, dokonano omówienia wyników badań oraz ich podsumowania. Bibliografia przewodnika liczy 242 pozycji, z których duża część jest z ostatnich pięciu lat, co świadczy o aktualności podjętej tematyki. Zamieszczono w nim również streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz dołączono publikacje wraz z bardzo obszernymi materiałami uzupełniającymi. Celem ułatwienia porównywania informacji zawartych we wspomnianych publikacjach i autoreferacie dołączono również zastosowaną numerację otrzymywanych i badanych związków oraz ogólne schematy prowadzonych reakcji.

W części literaturowej autoreferatu Doktorantka zdefiniowała pojęcia biokoniugatów i związków hybrydowych oraz omówiła właściwości i zastosowanie związków wykorzystywanych w syntezach badanych układów: indolu, graminy, imidazolu i pirazolu oraz kompleksów imidazolu. Ta część pracy w bardzo klarowny sposób uzasadnia podjęcie tematu pracy doktorskiej i jej ukierunkowanie na syntezę i badanie aktywności hemolitycznej, przeciwutleniającej oraz biobójczej pochodnych indolu jako obiecującej grupy nowych koniugatów. Należy podkreślić, że chociaż syntezы czterech z 39 badanych koniugatów indolowo-azolowych były wcześniej znane, jednak związki te otrzymywano na drodze bardziej skomplikowanych syntez. Doktorantka zaproponowała syntezę metodą „one pot”, co jest zgodne z zasadami „zielonej chemii” i ograniczaniem ilości etapów, ilości odpadów czy też wysokimi wydajnościami syntez. Dla większości badanych związków wydajności przekraczały 80-90% (prace P1-P4).

Interesujący jest również kierunek niektórych syntez koniugatów indolowo-tioketonowych, które prowadziły do otrzymania nie tylko oczekiwanych monomerów, ale również dimerów (praca P3). Wszystkie badane układy zostały w pełni scharakteryzowane metodami spektroskopowymi: ^1H i ^{13}C NMR, FT-IR, ESI-MS, wykonano analizę elementarną, a dla większości została również przeprowadzona analiza rentgenostrukturalna. W badaniach aktywności hemolitycznej, wykonanych we współpracy z Wydziałem Biologii UAM, Doktorantka wykazała, że większość otrzymanych koniugatów jest hemokompatybilna i może znaleźć zastosowanie w medycynie i produktach biomedycznych (prace P1-P4). Dla większości układów indolowo-imidazolowych utworzenie kompleksów z cynkiem obniża i tak niskie wartości aktywności hemolitycznej, podobnie jak obecność podstawników elektronodonorowych. Większe wartości tej aktywności obserwowano dla układów indolowo-tioketonowych, a najwyższe dla układów indolowo-pirazolowych (praca P2). W badaniach aktywności antyoksydacyjnej wykorzystano 2,2'-chlorowodorek-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH), a standardem umożliwiającym porównanie wyników był Trolox (prace P1-P4). Przeprowadzono również badania zdolności chelatujących otrzymanych hybryd, które wykazały że układy indolowo-imidazolowe mają zdolność wiązania jonów Fe^{2+} porównywalną ze zdolnościami kompleksującymi EDTA (praca P1 i P3).

Badania aktywności biologicznej prowadzone w ramach współpracy z Zakładem Biologii Komórkowej Wydziału Biologii UAM oraz Wydziałem Leśnym i Technologii Drewna Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu obejmowały badanie aktywności antybakteryjnej wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens* oraz aktywność antygrzybiczą wobec grzybów *Coriolus versicolor*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* i *Gloeophyllum trabeum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviridae* (prace P1-P4) Należy przy tym wspomnieć, że dwa ostatnie szczepy *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviridae* są naturalnymi fungicydami. Największą aktywność antybakteryjną wykazywały połączenia indolowo-pirazolowe, a utworzenie kompleksów z cynkiem nie miało zbyt korzystnego wpływu na tą aktywność (praca P3). W przypadku aktywności antygrzybiczej największą wykazywały układy zawierające pierścień pirazolu. Aktywność ta była dla większości badanych związków umiarkowana

i wysoka w stosunku do przynajmniej jednego szczepu. Niestereotypowa jest aktywność badanych kompleksów cynku w stosunku do szczepu grzyba *Botrytis cinerea*-zamiast hamować jego wzrost wszystkie kompleksy ten wzrost stymulowały (praca P-2).

Interesującą częścią pracy doktorskiej jest część obliczeniowa, w której Doktorantka z pomocą oprogramowania SwissADME wyznaczyła parametry fizykochemiczne badanych koniugatów, co pozwala określić ich przydatność jako potencjalnych leków (prace P1-P4). Wyniki obliczeń wykazały, że wszystkie z badanych związków spełniają kryteria Lipińskiego i Vebera, większość z nich przekracza barierę krew-mózg i jest rozpuszczalna w wodzie. Utworzenie kompleksów z cynkiem wpływa niekorzystnie na wchłanianie i przekraczanie bariery krew-mózg. Dla wybranych koniugatów o wysokiej aktywności cytoprotekcyjnej dokonano analizy dokowania molekularnego (prace P3 i P4)-powinowactwa do trzech domen białkowych: mieloperoksydazy, dehydrogenazy ksantynowej i cyklooksygenazy-2, które wykazały, że układy te wykazują podobne lub wyższe powinowactwo do dwóch pierwszych domen jak związki referencyjne. W przypadku cyklooksygenazy-2 układy indolowe wykazują mniejsze powinowactwo niż związek referencyjny.

Pomimo tego, że forma przewodnika nie podlega ocenie, to chciałbym podkreślić, że został bardzo starannie przygotowany pod względem językowym i graficznym, kolejność poszczególnych rozdziałów jest logiczna i czyta się go z przyjemnością. W tekście trafia się tylko na pojedyncze błędy literowe (np. na str.43 czy użycie angielskiego określenie „reflux” w schemacie 1 i 2, różny sposób zapisywania nazw niektórych szczepów grzybów), w tytule jednego z rozdziałów Doktorantka użyła raczej rzadko spotykanego określenie „badania w kryształach”. Moim zdaniem lepszy byłby tytuł „analiza rentgenograficzna” czy też „analiza rentgenostrukturalna”. W trakcie czytania dysertacji pojawiło się kilka zagadnień, które chciałbym przedyskutować z Doktorantką w trakcie obrony. Czy Doktorantka przeprowadzała próby kompleksowania jonów cynku pozostałymi grupami otrzymanych przez siebie hybryd, ewentualnie czy brała pod uwagę przeprowadzenia prób kompleksowania innych jonów, które mogłyby mieć wpływ na aktywność biologiczną otrzymanych koniugatów (np. jonów miedzi czy srebra)? W syntezie kompleksów został wykorzystany $ZnCl_2$, czy brana była pod uwagę możliwość zastosowanie innych soli np. octanu cynku i czy zastosowanie tej soli mogłoby mieć wpływ na strukturę otrzymanych kompleksów? Co, zdaniem Doktorantki, może być przyczyną, że jeden z badanych kompleksów cynku zamiast hamować,

stymulował wzrost grzybów *Botrytis cinerea* (różnice w budowie ścian komórkowych, rozpad kompleksu, rozpad hybrydy i stymulujący wpływ jednego z jej elementów)? W trakcie badań aktywności hemolitycznej i zdolności kompleksowania porównywano wyniki do powszechnie stosowanych wzorców (Trolox i odpowiednio EDTA). Czy w przypadku badania aktywności biologicznej: właściwości antybakteryjnych i antygrzybiczych również podjęto próbę porównania wyników do wzorców (np. nystatyna, chloramfenikol)? Doktorantka wyznaczyła parametry fizykochemiczne badanych układów metodami obliczeniowymi-czy podjęła próbę porównania np. obliczonej rozpuszczalności w wodzie z rzeczywistą ich rozpuszczalnością i czy zna inne metody obliczeniowe, które pozwalają wyznaczyć tego typu parametry?

Za najważniejsze osiągnięcia dysertacji uważam:

- Otrzymanie z relatywnie wysokimi wydajnościami trzech serii hybryd indolowych na drodze syntezy typu „one-pot”
- Pełną charakterystykę spektroskopową otrzymanych związków z analizą rentgenostrukturalną włącznie
- Zbadanie aktywności hemolitycznej, antyoksydacyjnej, bakteriobójczej i grzybobójczej koniugatów indolowych
- Określenie czynników wpływających na aktywność i strukturę badanych hybryd.
- Wyznaczenie parametrów fizykochemicznych pozwalających na ich potencjalne zastosowanie jako leków oraz analizy dokowania molekularnego dla najbardziej aktywnych układów

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia moim zdaniem merytoryczne i formalne wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 13 ust. 1 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Moje uwagi mają wyłącznie charakter dyskusyjny i nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę przedstawionej dysertacji. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie mgr Karoliny Babijczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozwadowski