

Ocena

pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawki pt. „Synteza, analiza spektroskopowa oraz badania biologiczne *in silico* nowych koniugatów steroidowych zawierających układy triazolowe”

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawki było otrzymanie trzech grup koniugatów zawierających w swoich strukturach układy steroidowe: sterole i kwasy żółciowe oraz pierścienie 1,2,3-triazolowe. Pierścienie te powstają w reakcji typu „click” Huisgena w obecności katalizatora miedziowego Cu (I). Planowano otrzymać następujące koniugaty: dimery kwasów żółciowych i steroli, quasi-podandy kwasów żółciowych oraz koniugaty steroidowo-pirymidynowe. Cel pracy obejmował również rozeznanie za pomocą analizy *in silico* aktywności biologicznej otrzymanych połączeń.

Tak sformułowany cel pracy uznaję za w pełni uzasadniony. Synteza nowych pochodnych steroidowych może prowadzić do połączeń o określonej aktywności biologicznej znajdujących zastosowanie farmakologiczne. Oczekiwania tego typu wynikają z tego, że już wyjściowe naturalne steroidy pełnią bardzo ważne funkcje fizjologiczne w organizmach żywych, jak i wykazują określone, bardzo istotne w leczeniu chorób aktywności farmakologiczne.

Dorobek publikacyjny stanowiący dysertację doktorską obejmuje 6 publikacji: 3 oryginalne prace twórcze oraz 3 artykuły przeglądowe. Prace prezentujące wyniki badań własnych zostały opublikowane w *Journal of Molecular Structure* (IF 3,8), *Journal of Organic Chemistry* (IF 3,6) oraz *ACS Omega* (IF 3,7). Jeden artykuł przeglądowy został opublikowany w *Bioorganic Chemistry* (IF 4,5), a dwa pozostałe zostały zamieszczone jako rozdziały w książkach: *Studies of Natural Products Chemistry* (Wydawca Elsevier, Amsterdam, 2024) oraz w *Na pograniczu chemii, biologii i fizyki – rozwój nauk, Tom VI* (Wydawnictwo Naukowe UMK, 2025). Do publikacji tych w dysertacji dołączone jest wprowadzenie do tematyki badań oraz

przewodnik prezentujący wyniki badań własnych zawartych w oryginalnych pracach twórczych.

W części literaturowej Autorka omawia szeroko grupę naturalnych steroidów, a więc ich pochodzenie, struktury oraz funkcje i aktywności biologiczne. Szczegółowo prezentuje naturalne sterole i kwasy żółciowe, łącznie z ich budową przestrzenną, a w przypadku kwasów żółciowych również ich biosyntezę z cholesterolu. Ostatni rozdział tego przeglądu stanowią informacje na temat skwalaminy, naturalnego koniugatu steroidowego składającego się z pochodnej dihydroksycholestanu i spermidyny, wyizolowanego z kolenia pospolitego. Połączenie to wspomaga układ odpornościowy w leczeniu wielu chorób nowotworowych oraz spowalnia postęp choroby Parkinsona.

W drugim rozdziale części literaturowej mgr inż. A. Kawka przybliżył znane z literatury chemiczne metody syntezy biokoniugatów steroidów. Na początku omawia ogólne metody addycji do podwójnego wiązania węgiel-węgiel oraz cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowane jonami miedzi Cu (I), a więc reakcji znanej w literaturze pod nazwą reakcji Huisgena, klasycznej reakcji typu „click”. Autorka prezentuje również poglądowo na schemacie mechanizm tej reakcji z udziałem katalizatora miedziowego Cu(I)AAC osadzonego na węglu aktywnym.

Na kolejnych stronach części literaturowej Autorka prezentuje znane z literatury metody syntezy 1,2,3-triazolowych pochodnych steroidowych. Na początku informuje o korzystnym wpływie układu triazolowego na właściwości fizyczne i aktywność biologiczną połączeń steroidowych. Następnie omawia metody wprowadzania grupy azydkowej i grupy alkinowej do steroli i kwasów żółciowych. Metody te popiera schematami syntez tych pochodnych znanych z literatury. Na zakończenie tego rozdziału przedstawia, w układzie struktura i właściwości biologiczne, pochodne triazolowe steroidów i biokoniugaty steroidów z pierścieniem triazolowym. W tej części pokazuje struktury biokoniugatów steroidowych z fukonazolem (aktywność przeciwgrzybicza i przeciwbakteryjna), koniugaty steroidowo-tiopurynowe (aktywność przeciwpasożytnicza) oraz koniugaty kwasów żółciowych z układem 1,2,3-triazolowym i urydyną, z deoksyadenozyną oraz skomplikowane strukturalnie dendrymery

z układami kwasów żółciowych i pierścieniami 1,2,3-triazolowymi o aktywności przeciwnowotworowej.

Większość informacji literaturowych pochodzi z artykułów przeglądowych opublikowanych przez Doktorantkę. Oceniając część literaturową opracowania trzeba przyznać, że dobór informacji w niej zawartych dobrze uzasadnia podjęcie badań objętych tematem pracy doktorskiej. W mojej opinii są to informacje dobrze wprowadzające do prezentacji wyników badań własnych.

W drugiej części opracowania, nazwanej słusznie przez Autorkę częścią eksperymentalną, mgr inż. A. Kawka prezentuje swoje dokonania i wyniki uzyskane podczas realizacji celów pracy doktorskiej.

W pierwszym rozdziale tej części opisuje badania nad syntezą dimerów kwasów żółciowych i steroli oraz struktury otrzymanych połączeń i analizę *in silico* ich aktywności biologicznej. Aby zsyntezować tę grupę koniugatów, trzeba było najpierw otrzymać odpowiednie substraty do reakcji typu „click”. Azydoacetoksy pochodną kwasu litocholowego Doktorantka otrzymała w czteroetapowej syntezie, a azydoacetoksy pochodne kwasów deoksycholowego i cholowego otrzymała w pięcioetapowej syntezie. W tym miejscu trzeba zauważyć, że otrzymane pochodne kwasów żółciowych są związkami nowymi. Reakcje estryfikacji cholesterolu i cholestanolu kwasem propargilowym dostarczyły kolejnych dwóch substratów, estrów propargilowych z terminalnym wiązaniem potrójnym węgiel-węgiel. Reakcje Huisgena prowadzono przy zastosowaniu siarczanu miedzi (II) i askorbinianu sodu do otrzymania katalizatora miedziowego. Trzeba podkreślić, że struktury połączeń otrzymanych w przeprowadzonych syntezach zostały ustalone ponad wszelką wątpliwość na podstawie danych spektroskopowych z widm ^1H i ^{13}C NMR, FTIR oraz ESI-MS. Dla koniugatów kwasów żółciowych z cholestereolem i cholestanolem wykonano również obliczenia PM5 ich ciepła tworzenia. Na tej podstawie dla koniugatu kwasu cholowego z cholesterolem zaproponowano struktury przestrzenne jego *syn* i *anti* izomerów.

Analiza *in silico* wykazała, że otrzymane koniugaty mogą wykazywać działanie antagonistyczne w stosunku do cholesterolu oraz aktywność przeciwzapalną przy infekcji trzustki. Badania dokowania molekularnego wykazały, że otrzymane preparaty mogą hamować wzrost szczepów bakterii *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* oraz

szczepów grzybów *Candida albicans*, *Aspergillus niger* i *Tryptococcus neoformans*. Ciekaw jestem jaki jest dalszy ciąg badań aktywności biologicznej, szczególnie przeciwpalnej przy infekcji trzustki.

Kolejną grupę pochodnych kwasów żółciowych nazwanych przez Doktorantkę quasi-podandami otrzymała w reakcji typu „click” 1,3,5-tris(azydometyleno)benzenu z estrem metylowym kwasu 3 α -propargiloksylitolowego lub z estrami metylowymi kwasów: 3 α -propargiloksy-7 α -acetoksydeoksycholowego i 3 α -propargiloksy-7,12-diacetoksycholowego. Estrы propargilowe kwasu litocholowego lub kwasu deoksycholowego i cholowego zostały otrzymane odpowiednio w 3- lub 4- etapowej syntezie z odpowiednich kwasów. Pochodne tych dwóch ostatnich kwasów są związkami nowymi. Reakcja Huisgena 1,3,5-tris(azydometyleno)benzenu z estrami 3-propargiloksy kwasów żółciowych dostarczyła z kwasem litocholowym dwóch produktów di- i tripodstawionych pochodnych oraz tylko tripodstawionych pochodnych kwasu deoksycholowego i cholowego. Struktury otrzymanych produktów potwierdzono metodami spektroskopowymi.

Badania *in silico* aktywności biologicznej otrzymanych quasi-podandów wskazały, że mogą one znaleźć zastosowanie jako antagoniści cholesterolu. Mogą działać jako inhibitory aktywności reduktazy HMG-CoA. Obliczenia wykazały, że mają one większe powinowactwo do białka 1HW8 niż mewastatyna, znany inhibitor reduktazy HMG-CoA.

Trzecią grupą syntezowanych koniugatów były połączenia steroidowo-pirymidynowe, a konkretniej połączenie cholesterolu lub cholestanolu lub kwasów żółciowych z uracylem lub 2-tiouracylem. Łącznikiem między tymi biocząsteczkami miały być pierścienie 1,2,3-triazolowe. Tak jak poprzednio, aby przeprowadzić reakcję typu „click”, Doktorantka musiała najpierw przygotować półprodukty do tej syntezy, a więc propargilowe pochodne uracylu i tiouracylu oraz 3- β -azydopochodne steroli. W reakcji azydopochodnych tiouracylu otrzymano dwie pochodne z grupami propargilowymi w pozycjach N(1), S i N(3), S. Są to związki nowe. W wyniku reakcji typu „click” otrzymała 9 nowych koniugatów pirymidynowych z kwasami żółciowymi i 2 koniugaty uracylu z cholesterolem i cholestanolem. Struktury wszystkich otrzymanych półproduktów i końcowych koniugatów zostały udokumentowane ich

danymi spektroskopowymi. Interpretując widma ESI-MS propargilowych pochodnych uracylu i tiouracylu Doktorantka przedstawiła ich ścieżki fragmentacyjne.

Obliczenia ciepła tworzenia koniugatów metodą PM5 wykazały, że najwyższą trwałością charakteryzują się koniugaty kwasu cholowego. Wyniki tych półempirycznych obliczeń pozwoliły zaproponować przestrzenną strukturę koniugatów cholesterolu z uracylem oraz kwasu deoksycholowego z 2-triouracylem.

Analiza aktywności metodą *in silico* wskazała, że otrzymane koniugaty mogą być aktywne w stosunku do bakterii *S. aureus* oraz *E. coli* oraz w stosunku do grzybów *C. albicans*. Ponadto analiza prognozuje aktywność inhibicyjną w stosunku do enzymów związanych ze stanami zapalnymi skóry oraz aktywność antycholestatyczną. Połączenia te mogą więc znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń przewodu żółciowego. Oceniając dokonania mgr inż. Anny Kawki podczas realizacji badań, na początku trzeba stwierdzić, że wykonała z naddatkiem postawione przed Nią zadania. W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymała 30 nowych pochodnych kwasów żółciowych i steroli. Struktury nowych związków ustalała głównie danymi z widm spektroskopowych. Na wyróżnienie zasługuje biegłość Doktorantki w interpretacji tych widm. W tym miejscu chciałbym jedynie zwrócić uwagę, że energia promieniowania w zakresie podczerwieni pochłaniana przez cząsteczkę jest zużywana na zwiększenie amplitudy drgań wiązań: drgań rozciągających pomiędzy atomami lub drgań deformacyjnych, zmiana kątów pomiędzy wiązaniami, a nie drgań atomów (strona 81).

Dla niektórych koniugatów wykonano obliczenia ciepła tworzenia i zaproponowano ich najbardziej prawdopodobne struktury przestrzenne. Stosując metody analizy *in silico* ustalono najbardziej prawdopodobne aktywności biologiczne otrzymanych pochodnych. Chciałabym się dowiedzieć, czy te przewidywane aktywności potwierdziły się w realnych testach biologicznych.

Oceniając poziom naukowy przeprowadzonych badań oraz wartość naukową uzyskanych wyników, stwierdzam, że badania zostały przeprowadzone zgodnie z dobrymi regułami, a uzyskane wyniki mają dużą wartość naukową, szczególnie w obszarze syntezy organicznej. O dużej wartości naukowej świadczą również tytuły czasopism, w których zostały opublikowane artykuły z uzyskanymi wynikami. Są to czasopisma znajdujące się w obiegu międzynarodowym i o określonym współczynniku

IF. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji celów pracy były również prezentowane w postaci komunikatów ustnych (11) oraz w formie posterów (10) na międzynarodowych (5) i krajowych (16) konferencjach naukowych. Dorobek publikacyjny mgr inż. Anny Kawki uzupełniają dwie współautorskie publikacje naukowe: jedna przeglądowa w *Clinical Nutrition ESPEN* (IF 2,9) i oryginalna, opublikowana w *Steroids* (IF 2,9).

Przedstawienie tych wyników w opracowaniu, które można nazwać przewodnikiem po artykułach przeglądowych i oryginalnych pracach twórczych, jest również na wysokim poziomie edytorskim. Praca napisana została bardzo dobrym językiem, a opracowanie graficzne schematów i struktur przestrzennych, no i oczywiście widm NMR są wzorcowe. Znalazłem jednak jeden błąd: w Schemacie 22 (strona 64), żaden substrat ani produkt nie jest aminocholiną.

W podsumowaniu mojej oceny pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawki stwierdzam, że jej realizacja przyniosła wartościowe naukowo wyniki w obszarze chemii organicznej. Prezentacja tych wyników w publikacjach i dysertacji jest również na dobrym poziomie. Stwierdzam zatem, że praca doktorska mgr inż. Anny Kawki pt. „Synteza, analiza spektroskopowa oraz badania biologiczne *in silico* nowych koniugatów steroidowych zawierających układy triazolowe” spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce i proszę Radę Naukową Dyscypliny Naukowej Chemia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Proszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej i jej Autorkę stosowną nagrodą.

