



## Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

---

**Prof. dr hab. inż. Barbara Gawdzik**

Instytut Chemii

Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

ul. Uniwersytecka 7

25-406 Kielce

b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 14.05.2026

### **Ocena Pracy doktorskiej Pana mgr inż. Grzegorza Hajdasia**

pt. „Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych o potencjalnych  
właściwościach przeciwdrobnoustrojowych”

Podstawę opracowania stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w sprawie powierzenia mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr inż. Grzegorza Hajdasia pt. „Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych” z dnia 20 lutego 2026 roku.

Kluczowym wyzwaniem współczesnej medycyny jest poszukiwanie nowych rozwiązań farmakologicznych umożliwiających skuteczne przeciwdziałanie narastającej oporności drobnoustrojów na stosowane antybiotyki. Szczególnie niepokojącym jest fakt, że zdolność patogenów do rozwijania i doskonalenia mechanizmów oporności znacząco przewyższa tempo opracowywania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. W odpowiedzi na te trudności coraz większe zainteresowania budzą innowacyjne strategie terapeutyczne oparte na integracji różnych mechanizmów działania. Perspektywicznym pod tym względem rozwiązaniem jest połączenie dwóch biologicznie aktywnych cząsteczek w jedną strukturę biokoniugatu. Tego rodzaju układy mogą stanowić alternatywę dla klasycznych farmaceutyków nie tylko pod względem modyfikacji właściwości fizykochemicznych, ale przede wszystkim z uwagi na potencjalny synergistyczny

efekt aktywności biologicznej. W ten obszar badawczy doskonale wpisuje się praca doktorska mgr inż. Grzegorza Hajdasia, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Pospieszego oraz dr inż. Hanny Koenig pełniącej funkcję promotora pomocniczego.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została zredagowana na podstawie następujących prac naukowych: Click chemistry as a method for the synthesis of steroid bioconjugates of bile acids derivatives and sterols, *Steroids*, 2023, 199, 1-12.; Synthesis, Hemolytic Activity, and In Silico Studies of New Bile Acid Dimers Connected with a 1,2,3-Triazole Ring, *ACS Omega*, 2024, 9(37), 39277-39286; Changing the game: innovative applications of steroid conjugates, *Na pograniczu chemii, biologii i fizyki - rozwój nauk. Tom 6. Wydawnictwo Naukowe UMK, Toruń, Polska*, 2025, 11-30; Recent Advances in Steroid Discovery: Structural Diversity and Bioactivity of Marine and Terrestrial Steroids, *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(7), 3203; Formylated Bile Acid-Steroid Conjugates: Synthesis, Antifungal Properties, and in silico studies, *ACS Omega*, 2025, 49, 60152-60161.

Licząca 133 strony dysertacja została podzielona zgodnie z przyjętymi standardami na dwie części: literaturową i doświadczalną. Zilustrowana rysunkami (31), schematami (63) oraz tabelami (11), zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, podsumowanie, wykaz stosowanych skrótów, cytowanej literatury, materiały uzupełniające, na które składa się sześć publikacji, oświadczenia współautorów dotyczące ich merytorycznego udziału w pracach stanowiących podstawę dysertacji oraz wykaz stosowanych skrótów i akronimów, ułatwiający lekturę rozprawy.

Część literaturową, poprzedza wstęp ze sprecyzowanym zadaniowo celem, którym było opracowanie strategii otrzymywania nowych pochodnych steroidowych oraz ich kompleksowa charakterystyka pod kątem właściwości fizykochemicznych i przeciwdrobnoustrojowych, a także analiza korelacji pomiędzy strukturą zsyntezowanych produktów a wykazywaną przez nie aktywnością biologiczną.

W pierwszych czterech rozdziałach Autor opisał budowę, klasyfikację oraz znaczenie biologiczne steroidów i ich pochodnych: steroli, stanoli, a także kwasów żółciowych, konsekwentnie podkreślając rolę zróżnicowania strukturalnego w determinowaniu ich funkcji biologicznych. Następnie przedstawił zagadnienia

dotyczące chemicznych modyfikacji steroidów oraz wieloetapowych procesów ich syntezy, zwracając uwagę czytelnika na kluczowe aspekty funkcjonalizacji, takie jak selektywność reakcji, wynikająca z obecności wielu centrów reaktywności oraz właściwy dobór reagentów i metod protekcji grup karboksylowych i hydroksylowych.

Na kolejnych stronach zostały podane przykłady klasycznych modyfikacji strukturalnych pierścieni szkieletu steroidowego z wykorzystaniem reakcji halogenowania, utleniania, alkilowania, redukcji, substytucji elektrofilowej, reakcji Suzuki oraz Grignarda.

Po scharakteryzowaniu koncepcji chemii „click” jako nowoczesnego, selektywnego i efektywnego podejścia stosowanego w projektowaniu układów molekularnych, a zwłaszcza w kontekście otrzymywania koniugatów o potencjalnej aktywności biologicznej, Doktorant podał przykłady reakcji wprowadzania grup azydkowych oraz terminalnych grup alkinylowych, pełniących kluczową rolę w syntezie funkcjonalizowanych pochodnych steroidowych, a w szczególności koniugatów steroli i kwasów żółciowych.

Część literaturową zamyka rozdział, w którym Autor omawiając biokoniugaty steroidowe o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym podkreśla celowość prowadzenia badań nad projektowaniem nowych połączeń zawierających w swej strukturze pierścień cyklopentanoperhydrofenantrenowy, jako stabilnych farmaceutyków, o zwiększonej biodostępności i selektywności w stosunku do określonych receptorów.

Reasumując pragnę podkreślić, że w części literaturowej zatytułowanej „Seksja literaturowa” zostały przedstawione najbardziej istotne zagadnienia, które dobrze korespondują z problematyką badań wpisanych w dysertację doktorską.

W „Seksji badawczej” Autor opisał rezultaty badań, które charakteryzują się przemyślaną strategią postępowania i zasadniczo można podzielić je na dwa obszary tematyczne:

- synteza i analiza strukturalna połączeń steroidowych,
- określenie potencjalnych właściwości biologicznych oraz badania aktywności hemolitycznej i przeciwdrobnoustrojowej zsyntezowanych koniugatów steroidowych.

W wyniku trzyetapowego procesu, którego kluczowym etapem była reakcja cykloaddycji Huisgena estrów propiolowych kwasów żółciowych: litocholowego, deoksycholowego i cholowego z azydooctanowymi pochodnymi cholesterolu i 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -olu otrzymano sześć nowych koniugatów steroidowych **124-129** zawierających w swej strukturze pierścień 1,2,3-triazolowy. W analogiczny sposób z wykorzystaniem w roli substratów reakcji typu „click” propiolowych estrów kwasów litocholowego, deoksycholowego i cholowego oraz ich azydkowych analogów zostało zsyntezowanych dziewięć dimerycznych koniugatów odpowiednich kwasów żółciowych **136-144**. Natomiast dwunastu nowych mrówczanowych koniugatów steroidowych **153-164** dostarczyła reakcja cykloaddycji estrów kwasów: litocholowego, deoksycholowego, cholowego oraz cholesterolu i 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -olu zawierających terminalne ugrupowanie alkinyłowe z azydkowymi pochodnymi kwasów żółciowych: litocholowego, deoksycholowego, cholowego.

Strukturę wszystkich otrzymanych nowych tytułowych koniugatów steroidowych potwierdzono standardowymi metodami spektroskopowymi:  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, FT-IR oraz HR-ESI-MS.

Istotny etap uzupełniający badania eksperymentalne stanowią obliczenia semiempiryczne metodą PM5 oraz analizy *in silico* obejmujące predykcję aktywności biologicznej (PASS) i dokowanie molekularne, które umożliwiły wstępną ocenę potencjalnej bioaktywności oraz identyfikację możliwych celów molekularnych. Uzyskane wyniki dostarczają interesujących przesłanek na temat stabilności termodynamicznej, potencjalnych mechanizmów działania oraz korelacji pomiędzy strukturą zsyntezowanych koniugatów steroidowych a ich aktywnością biologiczną. Autor podkreśla znaczenie liczby i rodzaju podstawników oraz charakteru łącznika triazolowego w modulowaniu właściwości farmakologicznych. W przypadku analizy PASS dla dimerów kwasów żółciowych i steroli **124-129** przewidziane zostały działania hipolipemiczne i antagonistyczne w stosunku do cholesterolu oraz aktywność antyhipercholesterolemiczna i hamowanie hydrolazy acylokarnityny. Wytypowaną aktywnością biologiczną dla octanowych pochodnych kwasów litocholowego, deoksycholowego i cholowego **136-144** była krioprotekcja i działanie hipolipemiczne, antywirusowe, a także działanie inhibicyjne wobec polipowatości

gruczolakowej. Natomiast dla koniugatów mrówczanowych **153-164** program Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) zaproponował szerokie spektrum potencjalnych bioaktywności, spośród których najczęściej przewidywaną była inhibicja aktywności monooksygenazy eteru glicerylowego - enzymu uczestniczącego w metabolizmie lipidów.

Na podstawie wyników analizy PASS oraz badań cytotoksyczności *in vitro* z udziałem ludzkich erytrocytów Autor wybrał do dokowania molekularnego zróżnicowane strukturalnie trzy steroidowe dimery kwasu litocholowego **136**, deoksycholowego **140** i cholowego **144**, które wykazywały obniżoną aktywność hemolityczną w stosunku do substratów. Natomiast kryterium wyboru celów molekularnych: gyrazy DNA i transglikozylazy związanej z Lipidem II była ocena aktywności przeciwbakteryjnej. Do oceny inhibicji biosyntezy cholesterolu przez koniugaty kwasu litocholowego **124** i **127** zastosowano reduktazę 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA). W celu określenia właściwości przeciwgrzybiczych mrówczanowych pochodnych kwasu deoksycholowego **159** i kwasu cholowego **160** w stosunku do *Fusarium culmorum* przeprowadzono dokowanie molekularne z udziałem syntazy trichodieniu (TRI5).

Uzupełnieniem badań *in silico* (PASS) oraz analizy potencjalnych oddziaływań ligand-białko z wykorzystaniem dokowania molekularnego, które pozwala na pełną ocenę potencjału farmakologicznego zsyntezowanych pochodnych steroidowych są przeprowadzone badania aktywności hemolitycznej i przeciwgrzybiczej. Testom na aktywność w stosunku do grzybów gatunku: *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma atroviridae* oraz *Trichoderma harzianum* były poddane wszystkie zsyntezowane mrówczanowe pochodne kwasów żółciowych z układem 1,2,3-triazolowym **153-164**.

W tym miejscu pragnę podkreślić, że zaprojektowana strategia syntezy biokoniugatów steroidowych i połączenie badań *in silico* oraz dokowania molekularnego z wielowymiarową oceną potencjału farmakologicznego i korelacją struktura-aktywność świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Rozprawę dokorską zamyka rozdział podsumowujący badania nad projektowaniem, syntezą i oceną bioaktywności nowych koniugatów steroidowych.

Ponadto zostały w nim sformułowane wnioski, a także przedstawiono perspektywy oraz przyszłe kierunki badań nad poszukiwaniem i modyfikacjami strukturalnymi selektywnych, a zarazem biodostępnych związków steroidowych.

Przechodząc do uwag, które wynikają z powierzonej mi roli recenzenta, pragnę zauważyć, że w Spisie tabel (strona 11) Autor zamieścił nie tylko tabele, ale również po raz kolejny wymienił 63 schematy. Nie zgadzam się ze stwierdzeniem, że o klasyfikacji i właściwościach fizykochemicznych steroidu decydują wyłącznie długość i rodzaj łańcucha bocznego przy C(17) (strona 19), ponieważ istotny wpływ wywierają również inne wymienione wcześniej elementy strukturalne, takie jak konfiguracja przestrzenna układu steroidowego, obecność wiązań podwójnych oraz rodzaj podstawników. Schemat 9 (strona 39) nie jest w pełni zgodny z opisem, ponieważ pochodna **41** nie jest estrem, gdyż jego struktura nie zawiera ugrupowania estrowego. Z kolei związek **42** nie jest „zredukowanym homologiem estradiolu”, ponieważ w pozycji C17 pierścienia steroidowego nadal obecna jest niezredukowana grupa karbonylowa. Na Schemacie 12 (strona 40) związek **49** nie jest enolową, a hydroksylową pochodną formestanu. Natomiast na Schemacie 13 (strona 41) oraz na Schemacie 19 (strona 45) błędnie zostały przedstawione struktury odpowiednio stebolonu i kwasu ftalowego. W wyniku reakcji eliminacji z udziałem kolidyny (Schemat 18, strona 44) tworzy się pochodna **68**, a nie **67**, jak podano w komentarzu na stronie 43. Ponadto reakcja hydrolizy prowadzi jedynie do usunięcia grupy acetalowej, a nie jak pisze Autor acetalowej i acylowej. Schemat 26 przedstawia syntezę izomeru *cis* 16 $\alpha$ -17 $\beta$ - estradiolu **101**, natomiast zaproponowana nazwa „*cis*-diolowa pochodna 17 $\alpha$ -benzoesanu estradiolu” nie odzwierciedla struktury otrzymanego związku. Przedstawiona struktura pochodnej pregnenolonu **113** nie potwierdza opisanego w komentarzu do Schematu 29 (strona 53) przebiegu reakcji, zgodnie z którym w trakcie reakcji Grignarda następuje eliminacja grupy acylowej. W pracy znalazłam kilka nieścisłości, które mogą wprowadzić Czytelnika w błąd, m.in odesłanie do nieistniejącego Schematu 64 (strona 104) oraz błędna numeracja związków np. związek **123** jest sterolowym substratem, a nie jednym ze steroidowych produktów **124-128** (strona 80). Ponadto Autor kilkakrotnie w tekście pracy powołuje się na źródła literaturowe, których nie cytuję np. na stronie 113. Pewne zastrzeżenie budzi sposób zapisu numeracji związków. W przypadku nazw niesystematycznych stosowanie

numerów w nawiasach, zarówno w tekście pracy, jak i na schematach reakcji, wydaje się nie w pełni konsekwentne, choć zagadnienie to można traktować jako kwestię redakcyjną.

Przechodząc do przedstawionej w dysertacji charakterystyki spektroskopowej zsyntezowanych pochodnych steroidowych pragnę zwrócić uwagę, że nie ma „podwójnego singletu” (strona 92), jest natomiast dublet lub dwa singlety, w dodatku ten kontrowersyjny opis nie może dotyczyć protonów metylenowych 27-CH<sub>2</sub>, ponieważ z węglem C27 nie jest związany żaden proton. Szkoda, że w przypadku sygnałów zinterpretowanych jako dublety Autor konsekwentnie nie podaje stałych sprzężenia oraz intensywności sygnałów, nie tylko w komentarzach ale również na zamieszczonych w pracy fragmentach widm <sup>1</sup>H NMR. Ponadto często pisząc o sygnałach nie precyzuje o jaki rodzaj sygnału chodzi np. przesunięcia protonów grup metylowych, sygnały dla protonów 26'-CH<sub>3</sub> i 27'-CH<sub>3</sub> (strona 81).

Podczas publicznej obrony pracy doktorskiej proszę Doktoranta o wyjaśnienie następujących kwestii:

- co Autor rozumie przez określenie „nakładanie pojedynczych rezonansów” (strona 92),
- dlaczego sygnał pochodzący od protonów metylenowych atomu węgla 29C pierścienia triazolowego (fragment widma <sup>1</sup>H NMR zamieszczony na Rysunku 23 A) został zinterpretowany jako dublet, a nie układ dwóch dubletów, oraz czy protony można uznać za homotopowe,
- czy zamieszczenie rozdziałów dotyczących badań potencjalnej aktywności *in silico* przed badaniami *in vitro* było zamierzone, czy też badania *in silico* – określone przez Autora jako mniej kosztowne i mniej czasochłonne – zostały przeprowadzone dopiero po analizie hemolitycznej i testach aktywności przeciwgrzybiczej.

Pragnę zaznaczyć, że w tekście pracy doktorskiej dostrzegłam pewne niedociągnięcia o charakterze stylistycznym, gramatycznym, interpunkcyjnym i edytorskim. Mają one jednak charakter formalny i nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej dysertacji, a zostały wskazane jedynie z recenzenckiego obowiązku.

Oceniając wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że do najważniejszych osiągnięć naukowych Doktoranta należy zaliczyć:

- zaprojektowanie strategii syntezy steroidowych koniugatów zawierających w swej strukturze pierścieni 1,2,3-triazolowy z wykorzystaniem chemii „click” (reakcja CuAAC), w wyniku której zostało otrzymanych 29 nowych, nieopisanych dotąd w literaturze steroidowych koniugatów mieszanych i dimerycznych pochodnych kwasów żółciowych: litocholowego, deoksycholowego, cholowego i steroli: cholesterolu, 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -olu, których struktury jednoznacznie potwierdziły analizy spektroskopowa NMR i FT-IR oraz spektrometria mas ESI-MS,
- umiejętne połączenie badań eksperymentalnych z analizą obliczeniową, dzięki czemu zastosowanie metod półempirycznych (PM5), predykcji aktywności biologicznej (PASS) oraz dokowania molekularnego pozwoliło na ocenę potencjalnych właściwości biologicznych badanych związków, a także na wstępne określenie korelacji struktura – aktywność,
- potwierdzenie badaniami *in vitro* aktywności biologicznej zsyntezowanych koniugatów steroidowych, w tym aktywności przeciwgrzybiczej oraz zróżnicowanego profilu aktywności hemolitycznej, a tym samym wskazanie potencjału aplikacyjnego niektórych steroidowych pochodnych jako związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Analizując w pełni zrealizowane przez Doktoranta cele badawcze, które wpisują się w aktualny nurt badań nad poszukiwaniem nowych i efektywnych metod otrzymywania oraz modyfikacji strukturalnych związków bioaktywnych, zwłaszcza pochodnych charakteryzujących się korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi, wyższą stabilnością oraz lepszym profilem farmakokinetycznym w porównaniu ze standardowo stosowanymi farmaceutykami, nie mam wątpliwości, że tematyka badań prowadzonych w ramach dysertacji doktorskiej badań jest istotna i aktualna. Jestem również przekonana, że uzyskane wyniki, mają zarówno wartość poznawczą, jak i aplikacyjną dla obszaru syntezy bioorganicznej i chemii medycznej.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja autorstwa Pana mgr inż. Grzegorza Hajdasia zatytułowana: „Otrzymywanie nowych koniugatów steroidowych o potencjalnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym z całym przekonaniem przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Grzegorza Hajdasia do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

*Prabone Gruski*