

Łódź, dnia 18 września 2024 r.

dr hab. Bogna Rudolf, prof. UŁ

Katedra Chemii Organicznej

Wydział Chemii Uniwersytet Łódzki

ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

tel.: (048) 042 635 57 55

e-mail: bogna.rudolf@chemia.uni.lodz.pl

www.chemia.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Berdzik

pt. Nowe pochodne graminy-synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena aktywności biologicznej

Praca doktorska Pani mgr Natalii Berdzik została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pani Natalia Berdzik jest autorką czterech prac opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej oraz siedmiu rozdziałów w monografiach w języku polskim i angielskim. Wyniki swoich badań Pani mgr Berdzik zaprezentowała na sześciu konferencjach krajowych, ze względu na okres pandemii cztery z tych wystąpień odbyły się on-line.

Zapobieganie stresowi oksydacyjnemu stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej nauki. Niekontrolowana produkcja reaktywnych form tlenu w organizmie ludzkim może prowadzić do szeregu chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, jak również innych jak cukrzyca, otyłość, miażdżyca... W warunkach stresu oksydacyjnego konieczne jest stosowanie efektywnych przeciwutleniaczy, w związku z tym podejmowane są próby projektowania i syntezy takich związków. Syntetyczne pochodne indolu ze względu na ich udowodnioną aktywność biologiczną (działanie przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwwirusowe) znalazły

zastosowanie w leczeniu szeregu chorób. Pochodnymi indolu są np. tryptany, szeroko stosowane leki przynoszące ulgę w atakach migreny. Bioaktywność pochodnych indolu zainspirowała Doktorantkę do opracowania nowych interesujących pochodnych indolu, a otrzymane w ramach pracy doktorskiej związki zostały zbadane pod kątem właściwości przeciwutleniających, przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych. W celu przybliżenia mechanizmu działania tych związków zastosowano również metody *in silico* (dokowanie molekularne, DFT, ADME).

W skład pracy doktorskiej wchodzi cykl czterech publikacji opublikowanych w latach 2022-2024 opatrzonych wstępem literaturowym (ok. 40 stron) i komentarzem dotyczącym wyników badań (ok. 20 stron). We wstępie literaturowym Doktorantka charakteryzuje pochodne indolu, zarówno pochodne otrzymane na drodze syntetycznej jak i związki pochodzenia naturalnego. Pani Natalia Berdzik w tej części pracy opisała farmakologiczne wykorzystanie pochodnych indolu z podkreśleniem właściwości oksydacyjnych tych związków. Dużo miejsca Autorka poświęciła również graminie, alkaloidowi występującemu naturalnie w roślinach z rodziny wiechlinowatych (*Poaceae*), który stanowił związek wyjściowy do syntezy pochodnych otrzymanych w ramach niniejszej pracy. Tak skonstruowany wstęp literaturowy pozwala na zapoznanie się z omawianą tematyką i umiejscowienie wyników w kontekście literaturowym.

Dalszą część pracy stanowią Wyniki badań, Podsumowanie, Spis Rysunków, Schematy przeprowadzonych syntez, Bibliografia (200 pozycji) oraz dwa Streszczenia w języku polskim i angielskim. Opis wyników badań jest formą komentarza do czterech publikacji naukowych, które tworzą trzon pracy doktorskiej. Dwie z nich zostały opublikowane w *Natural Product Research* (2022, 2023), a kolejne dwie w *Journal of Organic Chemistry* (2023) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (2024). Należy podkreślić, że w dwóch artykułach Pani Natalia Berdzik jest pierwszym autorem co świadczy o jej kluczowym udziale w przygotowaniu tych prac, potwierdzają to również zamieszczone na końcu pracy oświadczenia współautorów. Sądząc jednak z zamieszczonego w pracy komentarza nie wszystkie wyniki opublikowane w cyklu prac są osiągnięciem Autorki. W pracy opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*

opisane są między innymi indolowe pochodne zawierające w strukturze atom siarki, o których Pani mgr Berdzik w Opisie Wyników nie wspomina.

Cykl prac stanowiących podstawę recenzowanej dysertacji jest spójny tematycznie i dotyczy syntezy i badań biologicznych nowych pochodnych indolu. Pani Natalia Berdzik wyodrębniła w swojej pracy trzy grupy pochodnych indolu, które opisała kolejno: pierwszą grupę w pracach P1 i P2, drugą w pracy P3 oraz trzecią w pracy P4.

W pierwszych trzech pracach (P1-P3) pochodne indolu otrzymano przy wykorzystaniu 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydo-alkinowej katalizowanej miedzią(I) (CuAAC) co dodatkowo wzbogaciło produkty o pierścień triazolowy. W ramach pierwszej grupy pochodnych otrzymano w ten sposób dimery indolowe, pochodne indolu z pierścieniem benzenowym, jak również pochodne indolu zawierające ftalimid. Wszystkie otrzymane związki zostały przebadane w kierunku cytotoksyczności względem erytrocytów ludzkich. Większość otrzymanych pochodnych wykazała aktywność protekcyjną wobec wywołanej przez AAPH hemolizie krwinek czerwonych.

W pracy P3 opisano syntezę triazolowych pochodnych indolu oraz acetylowych i formylowych pochodnych kwasów żółciowych. Badania biologiczne otrzymanych biokoniugatów wykazały znacznie mniejszą aktywność hemolityczną, w porównaniu do odpowiednich kwasów żółciowych. W ostatniej pracy (P4) opisano serię *N*-podstawionych estrowych pochodnych indolu zawierających w pozycji C3 grupę etoksymetylową, jak również dwie estrowe pochodne indolu otrzymane w wyniku reakcji z pochodnymi kwasów benzoesowych. Z przeprowadzonych badań biologicznych wynika, że podstawienie heterocyklicznego atomu azotu obniża potencjał antyoksydacyjny tych związków, natomiast wykazują one działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Wszystkie otrzymane związki zostały scharakteryzowane przy pomocy metod spektroskopowych (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, MS).

Praca napisana jest starannie, znalazłam w niej jednak kilka błędów edytorskich, takich jak literówki, powtórzenia itp. Istotnym błędem jest podpisywanie we wstępie teoretycznym

schematów jako rysunki. Prawidłowo nazwane schematy pojawiają się dopiero w Opisie Wyników badań ale też nie wszędzie np. Schemat reakcji CuAAC również opisany jest jako rysunek, podobnie jak mechanizm reakcji CuAAC (rysunki 53 i 54). W pracy nie znalazłam wykazu skrótów co utrudnia czytanie pracy, szczególnie jeśli skróty nie są w tekście zdefiniowane (np. rys. 65, str. 55).

Nie mam uwag do opublikowanych wyników, które znalazły już akceptację i uznanie w procesie recenzji publikacji. Nie mniej jednak w trakcie czytania dysertacji nasunęło mi się kilka pytań, które mogą być tematem do dyskusji w czasie obrony pracy doktorskiej.

- 1) W wyniku reakcji 3-propargiloksymetyloindolu z benzenem z dwoma lub trzema grupami azydkowymi, mimo użycia odpowiedniego nadmiaru 3-propargiloksymetyloindolu otrzymano monomeryczne pochodne indolu. Zaprezentowane w pracy wyjaśnienie jest dyskusyjne, dlatego proszę o szerszy komentarz na ten temat.
- 2) Wyjaśnienia wymaga rysunek 65 na stronie 55. Z komentarza nad nim dowiadujemy się, że „Połączenia tych pochodnych z cząsteczką graminy nie wpłynęło znacząco na obniżenie aktywności hemolitycznej otrzymanych związków.” Prawdopodobnie chodzi tutaj o sole graminy z kwasami żółciowymi, co wynika z podpisu pod rysunkiem. Ponieważ nie znalazłam ani w opisie wyników ani w publikacji informacji na temat tych soli proszę o komentarz w tej sprawie. Druga kwestia to estry propargilowe kwasów tłuszczowych **30-36**, które są materiałem wyjściowym do syntezy triazolowo-indolowych pochodnych kwasów żółciowych. Z publikacji P3 wynika, że one również zostały przebadane w kierunku właściwości hemolitycznych. Przeprowadzone badania wykazały znaczne obniżenie aktywności hemolitycznej tych związków w stosunku do odpowiednich kwasów żółciowych. W opisie wyników nie znalazłam porównania aktywności hemolitycznej tych dwóch grup związków (tzn. **30-36** oraz **37-43**), proszę o komentarz na ten temat.

- 3) W opisie badań (str. 48) pojawiła się hipoteza, że połączenie dwóch ugrupowań o udowodnionej aktywności antyoksydacyjnej tzn. cząsteczki indolu oraz ftalimidu da efekt synergistyczny, natomiast otrzymane związki nie wykazały żadnych właściwości cytoprotekcyjnych, jak można to wytłumaczyć?
- 4) Aby móc zastosować "chemię click" należy sfunkcjonalizować dwie cząsteczki, które chcemy połączyć wprowadzając do nich ugrupowanie azydkowe lub alkinowe. Nie do końca jest jasne, które z pochodnych azydkowych i alkinowych zostały zsyntezowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, proszę o wyjaśnienie.
- 5) Jak brzmi prawidłowa nazwa odczynnika wywołującego hemolizę czerwonych krwinek AAPH?

Podsumowując, Pani mgr Natalia Berdzik poprzez swoje badania poszerzyła naszą wiedzę dotyczącą projektowania oraz aktywności biologicznej nowych pochodnych indolu, tym samym osiągnęła cel swojej pracy. Recenzowaną dysertację charakteryzuje dobry warsztat syntetyczny. Doktorantka z łatwością posługuje się „chemią click” i innymi metodami syntezy organicznej oraz prawidłowo korzysta z technik spektroskopowych. Należy podkreślić, że wiele z otrzymanych związków wykazuje właściwości cytoprotekcyjne wobec wywołanej przez AAPH hemolizie krwinek czerwonych. Na uwagę zasługuje fakt, że Pani Berdzik nie tylko zaprojektowała i zsyntezowała aktywne pochodne indolowe ale również przeprowadziła samodzielnie część badań biologicznych.

Zamieszczone przeze mnie w recenzji uwagi i zastrzeżenia mają charakter formalny lub polemiczny i nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej pracy. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Natalii Berdzik spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Natalii Berdzik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.