



UNIWERSYTET
O P O L S K I

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole
tel. 077 452 71 00
fax 077 452 71 01
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

Opole, 2024-09-12

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Natalii Berdzik

z tytułu

**„Nowe pochodne graminy – synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena
aktywności biologicznej ”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Natalii Berdzik została wykonana w na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są zagadnienia związane z opracowaniem sposobów syntezy nowych pochodnych graminy ważnych z punktu widzenia ich właściwości biologicznych i leży w zakresie badań prowadzonych przez grupę badawczą promotorki pracy doktorskiej. Prof. UAM dr hab. Beata Jasiewicz od lat bowiem prowadzi interesujące badania dotyczące otrzymywania nowych pochodnych związków naturalnych o potencjalnych właściwościach biologicznych. Badania te obejmują zarówno syntezę, charakterystykę spektroskopową i fizykochemiczną tych substancji, jak i ich aktywność biologiczną.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Berdzik, wykonana pod Jej kierunkiem, mieści się w tym zakresie i dotyczy syntezy nowych pochodnych indolu wykorzystując do tego celu znany alkaloid indolowy, graminę. Celem tej rozprawy było zatem otrzymanie nowych pochodnych indolu o potencjalnej aktywności antyoksydacyjnej, ich pełna charakterystyka spektroskopowa, a także określenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec wybranych gatunków grzybów i bakterii oraz badania *in silico*, pozwalające na zdefiniowanie powinowactwa pochodnych indolu do miejsc aktywnych określonych domen białkowych z wykorzystaniem dokowania molekularnego.

Oceniana rozprawa nie została napisana w klasycznym układzie pracy doktorskiej i zgodnie z przepisami zawartymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2 stanowi spójny tematycznie zbiór 4 prac opublikowanych w prestiżowych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) poprzedzony obszernym Autoreferatem. Autoreferat to w zasadzie 91 stronicowa monografia zawierająca życiorys naukowy Doktorantki, listę publikacji, krótki wstęp i określenie celu pracy, obszerną część literaturową zawierającą omówienie aktualnej literatury przedmiotu w zakresie charakterystyki i reaktywności indolu, naturalnych pochodnych indolu i ich właściwości biologicznych z uwzględnieniem mechanizmów działania antyoksydantów, reaktywności cząsteczki graminy i jej pochodnych o znaczeniu biologicznym. Część ta poparta jest aż 200 aktualnymi i dobrze dobranymi cytacjami z literatury. Po czym następuje omówienie wyników badań zawartych w załączonych publikacjach, syntetyczne podsumowanie, spis rysunków, schematy przeprowadzonych syntez, spis literatury i streszczenia w języku polskim i angielskim. Następnie zamieszczone są kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy zawierające szczegółowy wykaz odczynników i materiałów, stosowane metody badawcze, otrzymane widma i rysunki oraz tabele. Wszystkie prace, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, to prace wieloautorskie. W materiałach zamieszczono również oświadczenia określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów publikacji. Z oświadczeń tych wynika, że w pracach tych udział Doktorantki w ich realizacji był znaczący, zarówno w realizacji, jak i w opracowaniu manuskryptów publikacji. Analizując otrzymane materiały mam pewne wątpliwości dotyczące zamieszczonych oświadczeń współautorów i niektórych części opisu wyników, co przedstawiam poniżej i co wymaga wyjaśnienia:

1. Dlaczego nie ma oświadczeń:

dr W. Kozaneckiej-Okupnik, pierwszego Autora pracy P1

mgr. Damiana Nowaka współautora prac P2, P3 i P4

oraz dr hab. J. Starzyk współautorki pracy P4

2. W niektórych miejscach dziwne wydają się niektóre sformułowania dotyczące realizacji badań, jak na str. 49 „... zbadalam, we współpracy z...., pod kątem aktywności cytotoksycznej...”, czy na str. 52 „...przeprowadziłam także badania *in silico* parametrów ADME...”, kontekście oświadczeń współautorów stwierdzających, że wykonali i zinterpretowali te badania. To również wymaga wyjaśnienia.

Realizując bardzo ambitny program badawczy mgr Natalia Berdzik zsyntezowała i scharakteryzowała 35 nowych pochodnych graminy. Natomiast we współpracy z pracownikami Katedry Chemii kwantowej UAM przeprowadzono badania *in silico*, a z pracownikami Wydziału Biologii UAM i Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zbadano ich właściwości biologiczne. Związki te podzieliła na trzy grupy w zależności od zastosowanych metod syntezy oraz używanych substratów. Pierwsza grupa substancji to związki indolowo-triazolowe zawierające linkery alifatyczne o różnej długości łańcucha węglowodorowego oraz pochodne zawierające dodatkowo ugrupowanie fenylowe z podstawnikami aazydometylenowymi lub pierścieniem ftalimidowy. Te związki otrzymywała w reakcji „chemii click” (CuAAC), katalizowanej jonami miedzi. Ze względu na informacje literaturowe, z których wynikało że szerokie spektrum aktywności biologicznej wykazują dimeryczne pochodne indolu zsyntezowała cztery nowe, symetryczne dimery indolu i triazolu z odpowiednimi łącznikami alifatycznymi, a także pochodne indolu zawierające grupę triazolową oraz azydo- lub diazydometylobenzenowe. Struktury otrzymanych związków potwierdziła z wykorzystaniem analizy ^1H i ^{13}C NMR oraz widm masowych (ESI-MS). Natomiast biorąc pod uwagę fakt, iż aktywność przeciwtleniającą wykazują zarówno pochodne indolu, jak i ftalimidu, tą samą metodą zsyntezowała serię pochodnych indolilo-ftalimidowych z pierścieniem triazolowym połączonym różnej długości łańcuchami alifatycznymi. Struktury otrzymanych związków potwierdziła metodami spektroskopowymi (NMR i FT-IR). We współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii UAM określiła aktywność hemolityczną i cytotoksyczność otrzymanych związków. Ponadto w badaniach *in silico* określiła parametry ADME określające profil farmakokinetyczny badanych związków, ważny w potencjalnym zastosowaniu jako leków. Dla wybranych substancji wykazujących niską cytotoksyczność oraz wysoką aktywność cytoprotekcyjną zbadano ich potencjalne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne. Aktywność tę określono na podstawie powinowactwa do receptorów białkowych bakterii *Escherichia Coli* i grzybów z gatunku *Candida Albicans* wykorzystując metodę dokowania molekularnego.

Druga grupa zsyntezowanych przez Doktorantkę substancji to pochodne indolu i kwasów żółciowych zawierające dodatkowo grupę triazolową, wykorzystując do tego celu wymienioną wyżej metodę. Również w tym przypadku struktury otrzymanych związków potwierdziła metodami spektroskopowymi. Na podstawie sprawdzenia cytotoksyczności

otrzymanych związków stwierdziła, że acetylowe pochodne kwasów lithocholowego i deoksycholowego, a także formylowe pochodne wszystkich stosowanych kwasów wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną. Natomiast konjugaty indolu i kwasów żółciowych z pierścieniem triazolowym charakteryzują się znacznie niższą aktywnością tego typu. Wykorzystując metody modelowania molekularnego porównano wpływ poszczególnych grup na domeny białkowe bakterii *Escherichia coli* i grzybów z gatunku *Candida albicans* i wykazano, że wszystkie przebadane pochodne wykazują potencjalną aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną.

Trzecią grupę otrzymanych pochodnych indolu stanowią *N*-podstawione estrowe pochodne indolu zawierające w pozycji C3 grupę etoksymetylową i dodatkowo ester *N*-acetylo-3-metyloindolu i kwasu 2.5-dihydroksybenzoesowego. Metodami spektroskopowymi potwierdziła struktury otrzymanych pochodnych. Sprawdzono również aktywność cytotoksyczną tych substancji i wykazano, że większość z nich działa hemolitycznie wobec erytrocytów ludzkich w stężeniu 0,1mg/mL, jedna pochodna nie powodowała hemolizy krwinek czerwonych a trzy kolejne (z podstawnikiem alifatycznym) zaliczono do związków hemokompatybilnych. Jednakowoż obniżenie stężenia tych związków o jeden rząd, do stężenia 0,01mg/mL spowodowało zredukowanie ich aktywności hemolitycznej, co umożliwiło zbadanie ich aktywności cytoprotekcyjnej. Spośród badanych związków najwyższą aktywność przeciwutleniającą wykazały pochodne z podstawnikami fenyl-octanometylowym, pentanianometylowym i benzoowym. We współpracy z Katedrą Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zbadano aktywność przeciwbakteryjną tych związków wobec szczepów *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens*. Z badanych związków jedynie pochodna z podstawnikiem octano-*tert*-butylowym hamowała wzrost bakterii *Bacillus subtilis*. Natomiast większość z tych pochodnych wykazała interesującą aktywność przeciwgrzybiczną wobec gatunków *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* i *Botrytis cinerea*. Można było zatem skonstatować, że większość związków należących do tej grupy to potencjalne substancje przeciwgrzybiczne.

Biorąc pod uwagę fakt, iż zsyntezowane związki to pochodne substancji naturalnych o ciekawych właściwościach biologicznych uważam, że przedstawiona do oceny monografia to

bardzo szeroki i interesujący przykład pracy syntetycznej o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Uważam, że bardzo dobrze przygotowany był autoreferat zawierający obszerny przegląd literatury przedmiotu i omówienie wyników badań. Doceniam ogrom pracy syntetycznej i badań strukturalnych potwierdzających strukturę otrzymanych związków, co można stwierdzić na podstawie zamieszczonych kopii publikacji, a szczególnie suplementów do nich. Na uwagę zasługuje również fakt szerokiej współpracy ze specjalistami z różnych dyscyplin naukowych co znacznie wzbogaca tę pracę i dobrze świadczy o szerokich zainteresowaniach mgr. Natalii Berdzik. W tym miejscu jednak mam jedną uwagę. Analizując dostarczone materiały trudno jest stwierdzić które badania, oczywiście oprócz syntezy i badania struktur związków, Doktorantka wykonała osobiście.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej renomie.

Na podstawie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy przypuszczam, że Doktorantka sprawnie posługuje się językiem angielskim. Na uwagę zasługuje fakt, iż Autoreferat jest bardzo dobrze napisany i zawiera tylko kilka drobnych błędów literowych, w szerokim w końcu materiale, których nie warto nawet wymieniać.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Natalia Berdzik wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań z zakresu chemii organicznej, a szczególnie syntezy nowych związków organicznych, na bazie substancji pochodzenia naturalnego, badania ich budowy cząsteczkowej i określenia aktywności biologicznej. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Natalii Berdzik **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

