

Dr hab. inż. Jakub Adamek, prof. PŚ
Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Organicznej,
Bioorganicznej i Biotechnologii
e-mail: jakub.adamek@polsl.pl

Gliwice, 27.12.2024 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. **Marty Grabarek**

pt. „Synteza inhibitorów ureaz bakteryjnych o kowalencyjnym mechanizmie działania”

Recenzowana praca doktorska w dziedzinie *Nauki ścisłe i przyrodnicze* oraz dyscyplinie *Nauki chemiczne* została przygotowana na Politechnice Wrocławskiej pod opieką promotorską Pana prof. dr hab. inż. Artura Muchy.

Podstawa opracowanej recenzji

Podstawą opracowania recenzji jest Pismo dr hab. inż. Roberta Górnego, prof. PW - Przewodniczącego Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej nr 22/RDND10/2024 z dnia 22.10.2024 roku, dotyczące wykonania recenzji wspomnianej rozprawy.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska przygotowana przez Panią mgr inż. Martę Grabarek liczy 138 stron i jest utrzymana w klasycznej formie. Zawiera wykaz skrótów, wprowadzenie wraz z częścią literaturową (studia literaturowe), a także omówienie wyników w postaci opisu tzw. badań własnych i część eksperymentalną. Poza tym w rozprawie znajdziemy bibliografię, wykaz dorobku naukowego, a także streszczenie w języku polskim i angielskim. Dodatkowo, co warto podkreślić, Autorka rozprawy dołączyła tzw. materiały uzupełniające w postaci widm NMR zsyntezowanych produktów.

Osobiście uważam, że to doskonały pomysł, pozwalający Recenzentom szybko zweryfikować dane opisane w części eksperymentalnej. Praca jest dobrze przygotowana pod względem estetycznym i edytorskim. Jednak, jak to zwykle bywa przy tak obszernych opracowaniach, Doktorantka nie uniknęła potknięć językowych i edytorskich. Z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej kilka przykładów:

- strona tytułowa – Wrocław 2023 (chyba powinno być 2024?)
- str 18; ostatni wiersz: naturalną
- str 27: kolejność cytowania [54-53] -> [53-54]
- str 33: przedostatnie zdanie jest niezrozumiałe
- str 36; wiersz 6: wpływu zarówno wpływu
- schematy (np. 10 i 12); tabele (np. 5): w opisie podstawników R^1 , R^2 powinno się stosować raczej indeksy górne
- str 39; wiersz 3: kwercetyna zamiast kwarcetyna
- str 40; wiersze 14-15: „aktywności hamującej aktywność”
- str 41; wiersz 11: czy na pewno chodzi o kwas glutationowy?
- str 49: niefortunne stwierdzenia: „wydłużony kwas fosfinowy”; „rozszczenie”
- str 75: niefortunne stwierdzenie: „wartości aktywności biologicznej”
- str 80; wiersze 7-9: zdanie „Przede wszystkim ... przyniosły największy wzrost właściwości antyureolitycznych.” - skrót myślowy
- str 135, wiersz 13: koncentrując się na.

Bibliografia liczy sobie 91 pozycji. Większość to artykuły w czasopismach, ale pojawiają się też fragmenty książek, rozprawy doktorskie oraz patenty. Utrzymana jest w jednolitej konwencji choć zdarzają się drobne niedoskonałości, np.:

- 1: skrót czasopisma to *Ecol. Bull.*
- 19: to raczej fragment książki, a jest zacytowane jak artykuł.

Oczywiście niedociągnięcia te nie wpływają na pozytywną ocenę całej rozprawy.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Doktorantka we wprowadzeniu nakreśliła znaczenie podjętej tematyki zwracając uwagę na ważną rolę ureazy w różnych procesach (np. biogeochemicznym obiegu azotu w przyrodzie), a także na zagrożenia związane ze zbyt dużą aktywnością tego enzymu. Z takiego punktu widzenia możliwość kontroli aktywności ureazy z wykorzystaniem nowych inhibitorów wydaje się być niezwykle atrakcyjnym i inspirującym kierunkiem badań.

W rozdziale „*Studia literaturowe*” Autorka przedstawiła wszystkie najważniejsze informacje dotyczące ureazy, jej struktury, pochodzenia i znaczenia. Przytoczyła również ciekawe historyczne fakty łączące badania nad ureazą z wieloma pionierskimi odkryciami w naukach biochemicznych. W kolejnych rozdziałach zajęła się charakterystyką inhibitorów ureazy. Dokonała ich klasyfikacji pod względem struktury chemicznej (tabela 3, str 20) oraz sposobu wiązania z enzymem (inhibitory kowalencyjne i niekowalencyjne). W podrozdziałach znajdujemy informacje nie tylko na temat aktywności poszczególnych inhibitorów ale również metod ich syntezy. W tym miejscu miałbym trzy uwagi:

1. stosowanie oznaczenia X jako reszty aminokwasowej jest trochę niefortunne (Schemat 3)
2. wzory na schemacie 5 są nieco mylące (w jednym wzorze podany jest podstawnik ogólny R tymczasem związek **18** ma już konkretny podstawnik)
3. używanie nazw reakcji imiennych w moim odczuciu powinno być bardziej precyzyjne – proponowałbym kondensacja typu-Knoevenagela lub bezpieczniej kondensacja aldolowa (w tej najszerzej definicji).

W mojej opinii wstęp teoretyczny dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia, z którymi związana jest recenzowana rozprawa doktorska.

W kolejnym rozdziale Doktorantka opisała już badania własne. Jasno sprecyzowała cel swoich badań, czyli opracowanie nowej klasy inhibitorów ureaz o unikalnym sposobie działania. Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe Autorka zaproponowała/zaprojektowała struktury, które miałyby możliwość tworzenia zarówno kowalencyjnych jak i niekowalencyjnych interakcji z centrum aktywnym enzymu. Opierały się one na fosforoorganicznych pochodnych katecholu oraz fosforoorganicznych lub halogenowych pochodnych 1,2-benzisoselenazol-3(2H)-onu. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z przedstawieniem dość skomplikowanych i zróżnicowanych syntez

w przystępny i zrozumiały sposób. Na uznanie zasługuje fakt syntezy ponad 50 modeli potencjalnych inhibitorów ureazy, a także umiejętność wyciągania wniosków z eksperymentów, które nie zakończyły się sukcesem. Upór w dążeniu do celu, ciekawość i wnikliwość, którą wykazała się doktorantka zaowocowały również ciekawymi wynikami związanymi z wyizolowaniem, charakterystyką i wykorzystaniem związku P.1.4, a także reakcją estryfikacji opisaną na stronach 51-52.

Ostatnim etapem badań realizowanych przez Panią mgr inż. Martę Grabarek była weryfikacja właściwości biologicznych otrzymanych związków, której efekty opisano w podrozdziale 3.6. „Aktywność biologiczna związków”. Badanie te były realizowane we współpracy z dr. inż. Wojciechem Taborem oraz dr. Agnieszką Grabowiecką, a także dr. Pawłem Krzyżkiem. W tym miejscu chciałbym zapytać jak duży był udział Doktorantki w przeprowadzonych badaniach. Nie do końca rozumiem jaki był zamysł Autorki związany z umieszczeniem cytowania 87 i 88 w pierwszym zdaniu wspomnianego wcześniej podrozdziału 3.6.

Aktywność biologiczną otrzymanych związków określono wyznaczając stałą dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor (K_i) dla pomiarów wobec natywnej ureazy z bakterii *Sporosarcina pasteurii* oraz parametr IC_{50} dla pomiarów wobec żywych komórek *Helicobacter pylori*.

Wszystkie zsyntezowane fosforowe pochodne katecholi były mikromolarnymi inhibitorami natywnej ureazy. Na podstawie wyników modelowania wykazano ponadto, że związki te mają możliwość oddziaływania z enzymem zgodnie z założeniami, tj. wykazując podwójny mechanizm inhibicji. Oceniono również możliwości tych związków do kontrolowania rozkładu mocznika w żywych komórkach *H. pylori*, a także działanie cytotoksyczne względem komórek eukariotycznych (linie komórkowe: 3T3-L1 oraz HEK-293).

Podobne badania wykonano dla fosfonowych (podrozdział 3.6.2) i halogenowych pochodnych *N*-benzylo-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-onu (podrozdział 3.6.3). Okazały się one nanomolarnymi inhibitorami. W każdej grupie związków zidentyfikowano także struktury niezwykle aktywne antyureolitycznie w badaniach *in vitro* względem *H. pylori*.

Doktorantka zasygnalizowała, że badania korelacji struktura/aktywność są/i będą kontynuowane np. we współpracy z Uniwersytetem Bolońskim w celu uzyskania kompleksu ligand/białko.

W części eksperymentalnej pracy znajdziemy ogólne informacje związane z przeprowadzonymi syntezami i analizami; w głównej mierze przepisy preparatywne i opis właściwości fizykochemicznych (w tym dane spektroskopowe) otrzymanych związków.

Brakuje charakterystyki IR, a z nazewnictwem niektórych związków trudno mi się zgodzić (np. podstawnik metoksykarbonylowy -COOMe traktowany jako grupa metoksy + okso w związkach P1.4-1.6).

Brak odnośników literaturowych wskazuje, że wszystkie przepisy (poza syntezą 4.2.2.5) są autorskie i wszystkie otrzymane związki do tej pory nie zostały opisane w literaturze (czy dobrze to rozumiem?).

W opisach właściwości spektroskopowych pojawiają się drobne błędy: np. związek P1.5, ^{13}C NMR: brakuje 1 sygnału; P2.3.3, ^1H NMR: 1,29 ppm powinno być 6H; P2.2.3, ^{13}C NMR: za dużo o 1 sygnał; P3.5, ^1H NMR: 5,05 ppm powinno być 2H; związki P3.13-3.15, ^{13}C NMR: multipletowość sygnału grupy CF_3 powinna być q.

Podsumowanie – zagadnienia do dyskusji:

1. Nie zauważyłem w tekście, zwłaszcza w części eksperymentalnej odnośników literaturowych do opisów eksperymentów i otrzymanych produktów. Czy mogłaby Pani zatem potwierdzić, że wszystkie procedury są autorskimi rozwiązaniami (np. demetylowanie z zastosowaniem BBr_3 , synteza fosfonianów na drodze reakcji Arbuzowa – procedura C)? Jak dobierano warunki poszczególnych reakcji (np. czas, temperatura itp.), w pracy nie opisywano tych etapów „optymalizacyjnych”.
Czy wszystkie otrzymane i scharakteryzowane w części eksperymentalnej związki były dotychczas nieznanne?
2. Czy przeprowadzała Pani analizy IR otrzymanych związków?
3. Często do oczyszczania stosowała Pani chromatografię typu flash – czy podejmowała Pani też próby krystalizacji otrzymanych związków?
4. Czy mogłaby Pani nieco przybliżyć aspekty stereochemiczne otrzymywania związków 1.4, 1.7, 1.8 (czy ma to swoje konsekwencje w opisie ich właściwości spektroskopowych)?
5. Czy zastanawiała się Pani nad wyjaśnieniem obserwacji opisanych na rysunku 13 (korelacja między zastosowanymi warunkami reakcji/odczynnikami a otrzymanymi produktami)?
6. Czy i jakie metody obliczeniowe stosowała Pani podczas realizacji doktoratu (na stronie 55 wspomniała Pani o szacowaniu odległości pomiędzy atomem siarki grupy tiolowej a kationem niklu; a na stronie 69 o modelowaniu sposobu wiązania inhibitorów)?

Ocena dorobku

Na dorobek Doktorantki składa się 5 publikacji naukowych; cztery z nich to publikacje punktowane z listy ministerialnej (140, 140, 100 i 70 punktów). W dwóch publikacjach związanych z tematyką doktoratu Pani mgr inż. Marta Grabarek jest pierwszym autorem (IF = 6.0 i 4.9).

Doktorantka była również współautorką 16 wystąpień konferencyjnych zaznaczając swoją obecność na takich międzynarodowych konferencjach jak European Symposium on Organic Chemistry, Tetrahedron Symposium czy International Conference on Phosphorus Chemistry.

W moim odczuciu, łączny dorobek Pani mgr inż. Marty Grabarek na tym etapie kariery naukowej jest dobry i wystarczający w kontekście uzyskania stopnia naukowego doktora.

Wniosek końcowy

Myślę, że zaprezentowane wyniki stanowią spójną i logiczną całość. W pełni spełniają kryterium nowości stawiane jako warunek konieczny związany z realizacją pracy doktorskiej.

W mojej opinii recenzowana praca doktorska pt. „Synteza inhibitorów ureaz bakteryjnych o kowalencyjnym mechanizmie działania” zrealizowana pod opieką promotorską Pana prof. dr hab. inż. Artura Muchy spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wniosuję zatem o dopuszczenie mgr inż. Marty Grabarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Jakub Adamek