

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”; „rozszczipienie”
- 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 najszerszej 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,  $^{13}\text{C}$  NMR: brakuje 1 sygnału; P2.3.3,  $^1\text{H}$  NMR: 1,29 ppm powinno być 6H; P2.2.3,  $^{13}\text{C}$  NMR: za dużo o 1 sygnał; P3.5,  $^1\text{H}$  NMR: 5,05 ppm powinno być 2H; związki P3.13-3.15,  $^{13}\text{C}$  NMR: multipletowość sygnału grupy  $\text{CF}_3$  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  $\text{BBr}_3$ , 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



PODPIS ZAUFANY

JAKUB  
ADAMEK  
27.12.2024 10:45:42 [GMT+1]  
Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym