

prof. dr hab. Jacek Ścianowski

Toruń, 19 grudnia 2024r.

Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

87-100 Toruń, ul. Gagarina 7

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marty Grabarek zatytułowanej „*Synteza inhibitorów ureaz bakteryjnych o kowalencyjnym mechanizmie działania*” wykonana na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z dnia 16 października 2024 roku.

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr inż. Marty Grabarek została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Artura Muchy w Katedrze Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

Dysertacja wpisuje się w tematykę badań prowadzoną w grupie profesora Artura Muchy, obejmującą projektowanie i syntezę biologicznie aktywnych pochodnych fosforowych, w tym inhibitorów enzymów. W ramach pracy doktorskiej Doktorantka podjęła się opracowania dogodnych warunków syntezy inhibitorów ureaz bakteryjnych zawierających w swojej strukturze fragmenty fosforo- i selenoorganiczne oraz zbadania ich właściwości inhibicyjnych.

Pod względem formalnym praca doktorska ma klasyczny układ obejmujący spis treści, wprowadzenie, studia literaturowe powiązane z tematyką pracy, na które przypada 28 stron, badania własne przedstawione na 35 stronach, trzypięcioronowe podsumowanie rozprawy doktorskiej i czterdziestostronicową część eksperymentalną, zawierającą opisy wykonywanych syntez oraz analizę fizykochemiczną otrzymanych pochodnych. Dysertacja zakończona jest bibliografią obejmującą 91 pozycji literaturowych oraz streszczeniem pracy w języku polskim i angielskim. W pracy znalazły się także materiały uzupełniające, w których Doktorantka zamieściła 67 rysunków widm ^1H , ^{13}C , ^{31}P i ^{77}Se NMR zsyntetyzowanych produktów końcowych.

Do pracy dołączone zostały informacje dotyczące aktywności naukowej Doktorantki, z których wynika, że jest ona współautorką pięciu publikacji naukowych, z czego dwie prace związane są z tematyką doktoratu (*Eur. J. Med. Chem.* IF = 6,0; 140 pkt. MNiSW i *Int. J. Mol. Sci.*, IF = 4,9 140 pkt. – artykuł przeglądowy) oraz 16 prezentacji konferencyjnych z czego 7 na konferencjach międzynarodowych.

Dysertację Doktorantka rozpoczęła od wprowadzenia, w którym opisuje biogeochemiczne znaczenie enzymu ureazy, wykorzystywaniu go w medycynie, przemyśle chemicznym i spożywczym. Píše też o skutkach nadmiernej aktywności ureazy i potrzebie kontroli jej aktywności. W części literaturowej prezentuje charakterystykę enzymu, rolę jaką odgrywa w metabolizmie związków azotowych, jego budowę, przykłady źródeł ureazy pochodzenia naturalnego i wpływ hamowania aktywności enzymu na powodzenie leczenia antybiotykami chorób pochodzenia bakteryjnego. Omawia również mechanizmy inhibicji ureazy polegające na niekowalencyjnych oddziaływaniach z jonami niklu znajdującymi się w centrum aktywnym enzymu lub tworzeniu wiązania kowalencyjnego z grupą tiolową cysteiny znajdującej się przy wejściu do centrum aktywnego. Następnie prezentuje przykłady inhibitorów enzymów z podziałem na inhibitory oddziałujące z enzymem: a) niekowalencyjnie, w tym pochodne mocznikowe, fosforoorganiczne, heterocykliczne, tiolowe i kwasy boronowe, b) kowalencyjnie, takie jak pochodne selenoorganiczne, polifenolowe, pochodne kwasu akrylowego i propargilowego oraz jony metali ciężkich. Dla prezentowanych przykładów podaje ich aktywność inhibicyjną wobec ureaz pochodzących z różnych szczepów bakteryjnych. W mojej opinii ta część dysertacji w syntetyczny sposób dobrze wprowadza w tematykę badań prowadzonych w pracy doktorskiej. Umożliwia zapoznanie się z aktualnym stanem wiedzy i uzasadnia podjęcie dalszych badań. Podsumowując uważam, że jest to ciekawy przegląd dotyczący właściwości oraz doniesień literaturowych na temat inhibitorów ureaz.

Badania własne Doktorantka rozpoczęła od sformułowania celu pracy. Założyła, że otrzyma nowe inhibitory ureaz, które będą zawierały elementy strukturalnie pasujące do centrum aktywnego enzymu, mogące jednocześnie koordynować jony niklu, jak i łączyć się z grupą tiolową. Założyła, że takie podejście umożliwi zwiększenie selektywności ich działania, przez co wpłynie korzystnie na zmniejszenie cytotoksyczności wynikającej z podawanej dawki. Zaplanowała, że otrzymane pochodne zostaną przebadane pod kątem aktywności względem

modelowego oczyszczonego enzymu bakteryjnego wyizolowanego z bakterii *Sporosarcina pasteurii*, a także przebadane zostanie ich działanie antyureolityczne względem komórek linii *Helicobacter pylori*. Strukturalnie zaplanowane do syntezy związki to pochodne katecholu i benzisoselenazolonu zawierające grupy fosfonowe i fosfinowe, a także pochodne benzisoselenazolonu modyfikowane na atomie azotu grupami benzyłowymi, podstawionymi w pierścieniu atomami chloru, fluoru i grupami trifluorometyłowymi. Badania Doktorantka rozpoczęła od syntezy pochodnych fosforowych katecholu. Startując z kwasu 2-(3,4-dimetoksyfenylo)octowego poprzez reakcję z formaldehydem, syntezę kwasu H-fosfinowego i jego modyfikacje strukturalne otrzymała założone fosforowe pochodne katecholu zawierające grupy karboksylowe i estrowe. Dodatkowo otrzymała też związek bez tych grup, wychodząc z 4-(2-bromoetylo)-1,2-dimetoksybenzenu. Reakcje wymagały optymalizacji polegających np. na wykorzystaniu mikrofal, różnych czynników sililujących, czy specyficznych warunków estryfikacji. Finalnie otrzymała 9 pochodnych, które wykorzystywała do badań biologicznych. Drugą grupą związków jaką opracowała były *N*-podstawione fosfonowe pochodne 1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-onu. Produkty były syntetyzowane w wyniku reakcji chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu z odpowiednimi, różniącymi się strukturalnie aminofosfonianami a następnie hydrolizy estrów fosfonowych. Doktorantka do tych syntez użyła aminofosfoniany zawierające fragmenty aryłowe, aryłowoalkilowe i alkilowe. Chlorek 2-(chloroseleno)benzoilu otrzymała w klasycznej metodzie z kwasu antranilowego poprzez diazowanie, reakcję z diselenkiem disodu, a następnie ogrzewanie otrzymanego kwasu 2,2'-diselenobiskarboksylowego z chlorkiem tionylu. Strukturę dwóch związków potwierdziła również analizą rentgenograficzną. Ponadto dla porównania zsyntetyzowała pochodne ftalimidowe kwasu alkilofosfonowego. W sumie opracowała 27 pochodnych. Trzecią grupą badanych związków były *N*-benzyłowe pochodne benzisoselenozol-3(2*H*)-onu otrzymane w wyniku reakcji chlorku 2-(chloroseleno)benzoilu z halogenowanymi w pierścieniu aromatycznym benzyloaminami. Doktorantka otrzymała 19 nowych związków podstawionych atomami chloru, fluoru i grupami CF₃. Wszystkie trzy grupy związków zostały przebadane pod kątem ich właściwości inhibicyjnych. Wyznaczone zostały stałe dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor (K_i) dla natywnej ureazy z bakterii *Sporosarcina pasteurii*, a także parametr IC₅₀ dla pomiarów wobec żywych komórek *Helicobacter pylori*. Wykazano, że pochodne katecholowe są mikromolarnymi inhibitorami ureazy z *Sporosarcina pasteurii*. Przedyskutowano wpływ podstawników na aktywność inhibicyjną. Dla najbardziej aktywnego kwasu fosfonowego

zawierającego dodatkową grupę karboksylową wykonano model kompleksu związku z ureazą. Wykazano dodatkowe oddziaływania ugrupowania karboksylowego. Wyizolowany związek okazał się być również najbardziej skutecznym inhibitorem rozkładu mocznika w żywych komórkach *Helicobacter pylori*, natomiast na podstawie dodatkowych badań wykazano, że jest on niskotoksyczny wobec komórek eukariotycznych *in vitro*. Dla pochodnych benzisoselenazolowych fosforylowane pochodne zawierające podstawnik aromatyczny okazały się być nanomolarnymi inhibitorami ureazy z *Sporosarcina pasteurii*. Na podstawie wyników wykazano, że estry fosfonowe wykazują lepszą aktywność niż kwasy, a główną rolę odgrywa kowalencyjny mechanizm oddziaływania z cysteiną. Pochodne benzisoselenazonowe były również aktywne wobec zdolności do kontrolowania rozkładu mocznika w żywych komórkach *Helicobacter pylori*, a wynik $IC_{50} = 29\text{nM}$ okazał się być najlepszym w całej pracy. Podobnie estry fosfonowe podstawione terminalnie w *N*-alifatycznej reszcie benzisoselenazonu okazały się być nanomolarnymi inhibitorami ureazy z *Sporosarcina pasteurii*. Wykazano, że obecność pierścienia izoselenazolowego jest kluczowa dla mechanizmu inhibicji. Fosfonowe pochodne benzisoselenazonu wykazywały umiarkowaną lub niską toksyczność antyproliferacyjną. Przeprowadzone badania dla halogenopochodnych *N*-benzylo-1,2-benzisoselenazon-3(2*H*)-ów wykazały, że również one są nanomolarnymi inhibitorami ureazy z *Sporosarcina pasteurii*. Najbardziej aktywne były pochodne zawierające jeden lub dwa atomy fluorowca, a najlepszy wynik został otrzymany dla pochodnej zawierającej dwa podstawniki chloru w pozycji 2 i 4. Natomiast najlepsze hamowanie ureolizy *Helicobacter pylori* wykazała pochodna zawierająca w pozycji 3 atom fluoru a w pozycji 4 grupę CF_3 , podczas gdy pochodna z dwoma atomami chloru okazała się najgorsza.

W mojej opinii zaprezentowane rezultaty badań spełniają założone cele rozprawy, a otrzymane pochodne i przeprowadzone badania biologiczne wnoszą istotny wkład w badania nad inhibitorami ureaz. Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Najbardziej istotne elementy jakie praca doktorska wnosi do wiedzy to:

- opracowanie warunków syntezy trzech grup związków o potencjalnej aktywności inhibicyjnej dla enzymu ureazy,
- wykazanie, że kluczową rolę dla aktywności inhibicyjnej odgrywa fragment benzisoselenazolowy, a pochodne katecholowe są znacznie mniej aktywne,

– ustalenie, iż benzisoselenazolony charakteryzują się wysokim potencjałem hamowania ureolizy *Helicobacter pylori* przy stosunkowo niskiej toksyczności.

Z formalnego punktu widzenia praca napisana jest poprawnym językiem, a cele i wnioski są wyraźnie sformułowane. Opisy eksperymentalne są wystarczająco szczegółowe, a do opisów dołączone są analizy widm ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{77}Se , ^{19}F NMR i analizy HRMS oraz oryginalne widma produktów końcowych.

Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich w pracy, które jednakże nie wpływają na ogólną ocenę zaprezentowanych badań. Na przykład tytuł Schematu 1 na stronie 23 sugeruje, iż będzie prezentowanych wiele pochodnych, a dotyczy on tylko syntezy i aktywności jednego związku. Na Schemacie 2 podstawnik R opisywany jest jako 3,4-(OH) $_2$ Ph, *p*-CH $_3$ Ph, a powinno być raczej 3,4-(OH) $_2$ C $_6$ H $_3$ i *p*-CH $_3$ C $_6$ H $_4$. Ten sam zapis pojawia się również na kolejnych schematach. W pracy pojawiło się również kilka literówek np. kwarcetyna zamiast kwercetyna str 39 i inne. Nazwy czasopism powinny być podawane jednakowo, skrótnymi więc np. Ecological Bulletins powinien być zapisany jako Ecol. Bull. poz 1. W opisie książki w poz.12 zabrakło edytorów, wydawcy i miejsca wydania książki, a cytowany rozdział powinien mieć nr 4.

Po zapoznaniu się z dysertacją stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Marty Grabarek spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce [Dz. U. 2018 poz. 1668, z późn. zm.]. Zwracam się więc do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Marty Grabarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wartość merytoryczną pracy i potencjalne znaczenie uzyskanych wyników, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Maciej Świąnowski