

Łódź, dnia 23 stycznia 2026 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 Pani mgr inż. Joanny Stefaniak-Skorupy
pt. Nowe potencjalne chemoterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe oparte na strukturze
aminokwasów**

Praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Stefaniak-Skorupy została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Marii J. Milewskiej na Politechnice Gdańskiej. Rezultaty badań doktorantki stały się podstawą sześciu prac naukowych opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Report, dodatkowo jedna praca jest obecnie w trakcie publikacji. Należy podkreślić, że w czterech z tych prac Pani mgr inż. Stefaniak-Skorupa jest pierwszym autorem, co świadczy o jej kluczowym udziale w ich przygotowaniu. Wyniki swoich badań Pani mgr inż. Stefaniak-Skorupa zaprezentowała na siedmiu konferencjach w kraju i za granicą. Przeprowadzone badania zostały sfinansowane w ramach dwóch projektów (NCN OPUS, IDUB) o zbliżonej tematyce. Niniejsza praca doktorska wpisuje się w zakres zainteresowań naukowych Pani promotor Prof. Marii Milewskiej, która od wielu lat zajmuje się opracowaniem skutecznych metod zwalczania grzybów oraz innych mikroorganizmów.

Walka z chorobotwórczymi drobnoustrojami staje się coraz trudniejsza w obliczu narastającego zjawiska wielolekooporności. W przypadku zakażeń grzybami kluczową strategią może być dostarczenie leku do celu molekularnego i uwolnienie go w przestrzeni wewnątrz

komórkowej drobnoustroju. Efektywny transport leków przez błony komórkowe jest dużym wyzwaniem, ponieważ mogą one ulegać szeregu modyfikacjom. W związku z tym podejmowane są działania mające na celu zmylenie mechanizmów obronnych cząsteczki patogenu, wykorzystujące nowe metody transportu chemoterapeutyku do komórki przy wykorzystaniu łatwo wnikaających przez błonę komórkową nośników. Innym podejściem do walki z tymi drobnoustrojami jest projektowanie nowych substancji o właściwościach przeciwwgrzybiczych w oparciu o znane cele molekularne. Ponieważ niniejsza praca doktorska dotyczy tego niezwykle interesującego i ważnego obszaru badań, wybór tematu pracy uważam za w pełni uzasadniony. Tym bardziej, że podjęte w niej badania mają charakter interdyscyplinarny i poszerzają dotychczasową wiedzę na temat tego zagadnienia.

Dysertacja doktorska liczy 175 stron i podzielona jest w sposób klasyczny. Jej podstawowe części liczą odpowiednio: przegląd literatury 33 strony, omówienie wyników badań wraz z podsumowaniem 48 stron, część eksperymentalna 55 stron. Dodatkowo w pracy znajdziemy streszczenia w języku polskim i angielskim oraz opis dorobku naukowego doktorantki, jak również spis literatury (198 pozycji) i wykaz stosowanych skrótów.

Przegląd literatury pracy doktorskiej stanowi zwięzłe i rzeczowe wprowadzenie do tematyki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Pierwsze trzy rozdziały tej części pracy dotyczą metod transportu leku do komórki patogenu. Wśród szeregu opisanych metod Doktorantka przedstawia metodę opartą na sideroforach związkach o wysokim powinowactwie do jonów żelaza (III). Ponieważ kompleksy sideroforów z jonami żelaza (III) mogą być łatwo transportowane przez błony komórkowe, można je również wykorzystać do transportu leków. Ciekawą metodą jest strategia „Konia Trojańskiego” gdzie chemoterapeutyk jest związany bezpośrednio lub przez łącznik z sideroforem. Wyniki badań wykazały, że takie związki są transportowane do wnętrza drobnoustrojów, natomiast ich aktywność biologiczna jest zależna od rodzaju wiązania pomiędzy sideroforem, a cząsteczką chemoterapeutyku. Doktorantka zwraca uwagę na układ zwany „trimethyl lock” (TML), który jest częstym łącznikiem wykorzystywanym

w syntezie proleków, układ ten pod wpływem określonego bodźca ulega procesowi laktonizacji uwalniając przy tym transportowaną cząsteczkę leku.

Ostatni rozdział części literaturowej poświęcony jest projektowaniu nowych cząsteczek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w oparciu o określone cele molekularne, których niestety w przypadku grzybów znanych jest niewiele. Doktorantka zwraca uwagę na możliwość blokowania biosyntezy związków niezbędnych do prawidłowego rozwoju patogennych organizmów grzybowych. Podkreśla wykorzystanie w tym celu inhibicji enzymów szlaku biosyntezy aminokwasów egzogennych, która zachodzi w komórkach grzybowych.

W rozdziale „Cel i zakres pracy”, Pani mgr inż. Joanna Stefaniak-Skorupa precyzuje dwa cele główne oraz szereg celów szczegółowych. W pierwszej kolejności Doktorantka zaprojektowała układy cząsteczka transportowana-nośnik, połączone bezpośrednio bądź przy pomocy łącznika (TML). Związki te zostały następnie poddane badaniom biologicznym, w celu ustalenia ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W swoich badaniach Doktorantka wykorzystała znany ze swojej przeciwgrzybowej aktywności aminokwas cispentacynę (CP), oraz *O*-karbamoilo-D-serynę (Kser) aminokwas o działaniu przeciwbakteryjnym, a z omówionych w części literaturowej nośników wybrała siderofor hydroksamowy ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksy-L-ornitynę (AHO). W celu ustalenia czy nośnik wnika do komórki patogenu, Doktorantka opracowała również cząsteczki składające się z sideroforu i barwnika fluorescencyjnego 4-cyjanotryptofanu (CNTrp). Pani mgr inż. Stefaniak-Skorupa bardzo dobrze uzasadniła wybór zarówno nośnika jak i transportowanych cząsteczek. Co więcej w przypadku wybranego nośnika AHO zaproponowała dwie metody połączenia inhibitorów enzymatycznych lub sondy fluorescencyjnej przez grupę aminową lub karboksylową. Celem tego zabiegu było sprawdzenie czy uzyskane proleki będą w tym samym stopniu rozpoznawane i transportowane do wnętrza komórek grzybów. Tutaj chciałabym podkreślić ogromną pracę syntetyczną jaką włożyła Doktorantka, aby uzyskać zaprojektowane układy. Pani mgr inż. Stefaniak-Skorupa korzystała co prawda ze znanych metod syntetycznych, jednak syntezowała wszystkie substraty wychodząc z prostych związków organicznych. Syntezy były wieloetapowe, a dodatkowo stopień trudności

podnosiła konieczność blokowania, a następnie odblokowywania szeregu grup funkcyjnych. W przypadku niepowodzeń Doktorantka proponowała nową drogę syntezy, co świadczy o jej dużej pomysłowości w rozwiązywaniu trudnych syntetycznych zagadnień. Badania biologiczne otrzymanych związków wykazały, że wszystkie związki zawierające sondy fluorescencyjne były skutecznie transportowane i akumulowane w komórkach *Candida albicans* i *Candida glabrata*, natomiast w przypadku badań innych drobnoustrojów w tym bakterii wyniki były negatywne bądź niejednoznaczne.

Aby uwolnić cząsteczkę aktywną otrzymane koniugaty z sideroforem muszą ulec rozkładowi, który może zachodzić pod wpływem enzymów obecnych w komórce patogenu. W związku z tym przeprowadzono badania rozkładu enzymatycznego otrzymanych koniugatów przez odpowiednio peptydazy i esterazy, a produkty rozpadu koniugatów monitorowano przy pomocy HPLC-DAD-MS. Tutaj chciałabym zaznaczyć, że o ile większość badań biologicznych przedstawionych w pracy została wykonana przez pracowników Katedry Technologii Leków i Biochemii PG, to część badań dotyczących rozkładu enzymatycznego została zrobiona przez Doktorantkę.

Wyniki badań dotyczących aktywności przeciwwgrzybowej biokoniugatów lek-siderofor jasno wskazują, że koniugaty zawierające łącznik TML są aktywniejsze od związków, w których cispentacyna jest połączona bezpośrednio z sideroforem. Jak słusznie zauważa Doktorantka wynika to zapewne z trudności w odłączeniu leku od nośnika w komórce patogenu w przypadku układów, gdzie lek jest bezpośrednio połączony z sideroforem.

Dotychczas opracowano niewielki wachlarz skutecznych leków przeciwwgrzybiczych, dlatego wszelkie próby syntezy nowych pochodnych o aktywności przeciwwgrzybiczej są bardzo wartościowe. W ten obszar wpisuje się drugi cel ocenianej pracy doktorskiej, jakim była synteza potencjalnych inhibitorów enzymów szlaku biosyntezy L-metioniny (MBP). Aktywność zaprojektowanych i zsyntezowanych w tym celu aminokwasów, oceniono następnie wobec wybranych enzymów szlaku MBP. W ramach tej części pracy Doktorantka zsyntezowała pięć

związków o różnej strukturze, dwa z nich to fosfonowe analogi seryny, dwa kolejne to pochodne kwasu 2,4-diaminobutanowego oraz pochodna (2H)-1,2-isoksazol-5-onu. Pierwsze cztery to związki nowe nie opisane w literaturze, natomiast pochodna (2H)-1,2-isoksazol-5-onu, została otrzymana na innej drodze niż wcześniej opublikowana. Badania biologiczne przeprowadzone na otrzymanych związkach wskazują na ich zdolność do inhibicji wybranych enzymów, najciekawsze wyniki otrzymano dla pochodnej (2H)-1,2-isoksazol-5-onu, związek ten wykazał również aktywność przeciwwgrzybiczą wobec *Candida albicans* i *Candida glabrata*.

Część eksperymentalna zawiera opis przeprowadzonych eksperymentów syntetycznych oraz charakterystykę zsyntetyzowanych związków z wykorzystaniem widm ^1H , ^{13}C , ^{31}P NMR i ESI-MS. W pracy nie znalazłam widm NMR, natomiast ich opis w części eksperymentalnej uważam za satysfakcjonujący.

Praca napisana jest bardzo starannie, choć Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów, głównie edytorskich. W całej pracy można znaleźć literówki, zdarzają się także niezbyt zgrabne sformułowania np. „struktury produktów potwierdziłam spektroskopią NMR lub spektrometrią mas”. W części eksperymentalnej znalazłam urwane zdanie (Związki 61ab– przepis ogólny „Kolejno...”), czy powtarzany błąd dotyczący czasu reakcji („na przez” w przepisach dla związków 61ab, 65, 76). W pracy Doktorantka posługuje się łacińskim skrótem *et al.*, gdy można zastosować polski – i wsp. Należy podkreślić estetyczną szatę graficzną pracy, którą cechuje dbałość o szczegóły. Wszystkie schematy są potraktowane jako rysunki, co jest pewną konwencją przyjętą przez Autorkę.

Nie mam uwag co do zawartości merytorycznej pracy, natomiast w trakcie czytania dysertacji nasunęło mi się kilka pytań, które mogą być tematem do dyskusji w czasie obrony pracy doktorskiej.

- czy zbadano efektywność transportu jonów żelaza (III) do wnętrza komórki patogenu przez siderofor AHO oraz jego koniugaty?

- próba sprzęgania związku **38** z sideroforem **23** nie powiodła się, z czego wynika brak sukcesu tej reakcji ? Czy powstają tam inne produkty czy też odzyskano nieprzereagowane substraty ? (str.70, rys. 3.15)

-niska skuteczność pochodnych fosforanowych **54** i **55** wobec enzymu Met2p jest wytłumaczona, między innymi nieokreśloną stereochemią atomu fosforu, w tych związkach, proszę o szerszy komentarz na ten temat. (str. 100)

-związek **57** jest przedstawiony w pracy jako nowy wcześniej nie opisany, przeczy temu zdanie „natomiast struktura związku **57** została zaproponowana w oparciu o wyniki dokowania molekularnego cząsteczki **57** do centrum aktywnego enzymu Met15p.1” str.87, proszę o wyjaśnienie.

-czy próbowano uzyskać struktury krystalograficzne otrzymanych związków?

Podsumowując, zamieszczone przeze mnie w recenzji uwagi mają charakter formalny lub polemiczny i nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej pracy. Badania zostały doskonale zaplanowane, a ich wyniki opisane w bardzo klarowny sposób. Opracowane rozwiązania wprowadzania leków do komórki z pomocą koniugatów AHO:TML są nowe i z pewnością przyczynią się do opracowania skutecznych leków przeciwgrzybowych. Oceniana praca doktorska świadczy o ogromnej pracowitości i zaangażowaniu Doktorantki w rozwiązywanie problemów w podjętej przez nią tematyce. W związku z powyższym wnoszę o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam też, że recenzowana praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Stefaniak-Skorupy 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 inż. Joanny Stefaniak-Skorupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.