



Uniwersytet
Gdański



WYDZIAŁ CHEMII
UNIwersytet GDAŃSKI

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka
KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48-58-5235088
e-mail: krzysztof.rolka@ug.edu.pl

Gdańsk, 2 stycznia 2026

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Stefaniak-Skorupy
p.t. *„Nowe potencjalne chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe
oparte na strukturze aminokwasów”*

Wprowadzenie do praktyki medycznej antybiotyków zaliczane jest do największych osiągnięć dwudziestego wieku. Niemniej, ich powszechne, a także nadmierne stosowanie, spowodowało rozwój mikroorganizmów opornych na ich działanie. Z tego powodu opracowanie nowych (o odmiennym mechanizmie działania) antybiotyków/chemioterapeutyków jest jednym z największych wyzwań medycyny dwudziestego pierwszego wieku. Do szczególnie niebezpiecznych należą bakterie Gram-ujemne oraz drożdżopodobne szczepy *Candida spp.* – oportunistyczne patogeny mające istotny (ponad 50%) udział w infekcjach w szpitalach, podnosząc znacząco zachorowalność i śmiertelność. Niektóre ze szczepów *Candida* wykazują lekooporność. Stąd konieczność opracowania nowych chemioterapeutyków działających wobec tych szczepów. Tworzenie koniugatów antybiotyków/chemioterapeutyków ma na celu poprawę ich właściwości farmakokinetycznych, a ew. odmienny, od chemioterapeutyku, mechanizm ich działania stwarza szansę na eliminację problemu lekooporności szczepów patogennych. Temat badań recenzowanej rozprawy doktorskiej bez wątpienia leży w głównym

nurcie współczesnej chemii medycznej. Dowodzi tego również bardzo bogate piśmiennictwo, nawiązujące do przedstawionej powyżej problematyki. W bazie PubMed® do hasła „*antimicrobial, conjugates*” znajduje się prawie 27 tyś. odwołań, a ich liczba w ostatniej dekadzie systematycznie rośnie.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska to 175 stron tekstu. Zasadnicze rozdziały pracy to: *Przegląd literaturowy* (34 strony), *Cel i zakres pracy* (1 strona), *Wyniki i dyskusja* (46 stron), *Podsumowanie i wnioski końcowe* (3 strony), *Część eksperymentalna* (55 stron), *Literatura* (198 pozycji). Opracowanie uzupełniają, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wykaz dorobku naukowego Doktorantki (6 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz 7 prezentacji posterowych). W rozprawie uwagę zwracają bardzo przejrzyste schematy ścieżek syntetycznych. Redakcja rozprawy jest na wysokim poziomie, co nie tylko ułatwia lekturę, ale w połączeniu z jej problematyką, czyta się ją z dużym zainteresowaniem.

W rozdziale zatytułowanym *Przegląd literaturowy* mgr inż. J. Stefaniak-Skorupa w sposób syntetyczny, ale wystarczający na potrzeby rozprawy wprowadza czytelnika w zagadnienia nawiązujące do Jej badań własnych. Na wstępie wyjaśnia potrzebę podjęcia badań nad opracowaniem nowych chemioterapeutyków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, a następnie przechodzi do opisu jednej z najbardziej obiecującej strategii, polegającej na efektywnym dostarczeniu chemioterapeutyku do jego celu molekularnego poprzez jego związanie z nośnikiem molekularnym. Spośród szeregu opisanych nośników, w swoich badaniach wykorzystwała jeden z sideroforów, dlatego też duża część tego rozdziału poświęcona jest charakterystyce tej grupy związków. Siderofory to drobnocząsteczkowe związki organiczne chelatujące jony żelaza, wykorzystywane przez drobnoustroje jako źródło tego pierwiastka. W zależności od typu grupy funkcyjnej wiążącej jon żelaza, wyróżniono 4 klasy, katecholany, kwas hydroksamowe, karboksylany i mieszane. Doktorantka podaje przykłady zidentyfikowanych sideroforów należących do poszczególnych klas, a także struktury kompleksów, jakie tworzą z jonami Fe (III). W kolejnym podrozdziale omawia mechanizmy transportu kompleksu żelazo-siderofor hydroksamowy przez błony komórek grzybowych; charakteryzuje także białka grzybów i bakterii Gram-ujemnych uczestniczące w tym procesie. Treść kolejnego podrozdziału bezpośrednio koresponduje z badaniami własnymi Kandydatki. Znajdują się tutaj przykłady koniugatów, w których siderofor pełni funkcję nośnika molekularnego dostarczającego chemioterapeutyk do wnętrza komórki mikroorganizmu. Część z opisanych koniugatów charakteryzowała się korzystniejszym profilem aktywności przeciwdrobnoustrojowej niż macierzyste chemioterapeutyki. Niektóre z nich zawierały

jedynie fragmenty naturalnie występującego sideroforu, co z punktu widzenia projektowania związków o potencjale terapeutycznym, jest okolicznością bardzo pożądaną. Ważnym elementem koniugatu jest łącznik spinający nośnik molekularny z cząsteczką transportowaną. W swoich badaniach Kandydatka zdecydowała się na wykorzystanie układu określanego jako trimethyl lock (TML). Charakterystyka łącznika TML opisana została w kolejnym podrozdziale. Ten rozszczepialny łącznik oparty na strukturze kwasu 3-(2-hydroksy-4,6-dimetylofenylo)-3-metylobutanowego, dzięki bliskiemu sąsiedztwu trzech grup metylowych ulega laktonizacji, uwalniając fragmenty (składowe koniugatu) przyłączone do grupy karboksylowej i fenolowej. Procesem tym można sterować, inicjując uwolnienie grupy hydroksylowej poprzez proteolizę wiązania estrowego w wyniku działania esteraz albo fosfataz, redukcję w układach *in vivo* czy promieniowanie UV. Rozdział ten kończy opis szlaku syntezy biosyntezy L-metioniny w komórkach grzybów. Ponieważ jest on odmienny od przebiegającego w komórkach ssaków, zahamowanie aktywności poszczególnych enzymów stwarza racjonalną przesłankę do opracowania selektywnych związków o działaniu przeciwgrzybowym. Jako cele molekularne opisane w literaturze Doktorantka wymienia transacetylazę L-homoseryny (Met2p), syntazę L-metioninową (Met6p) oraz sulfhydrylazę O-acetylo-L-homoseryny (Met15p). Inhibitory ostatniego z enzymów nie były dotychczas opisane jako związki o działaniu przeciwgrzybowym. Bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny tego rozdziału. Lektura tekstu przekonuje, że Doktorantka bardzo dobrze poznała problematykę związaną z tematem rozprawy, zarówno od strony chemicznej, jak też aspektów biologicznych. Dobór literatury cytowanej uważam za właściwy. Doktorantka odwołuje się do wyników opisanych w pracach ostatnio publikowanych. Również strona edytorska nie tylko tego rozdziału jest na wysokim poziomie, co przekonuje, że Doktorantka potrafi redagować teksty o charakterze naukowym. Świadczy to bez wątpienia o dużej dojrzałości naukowej Kandydatki.

Problematyka przedstawiona w części przeglądowej w pełni uzasadnia cel recenzowanej rozprawy, jakim było zaprojektowanie, a następnie chemiczna synteza związków o działaniu przeciwgrzybowym. Przedmiotem badań Kandydatki były dwie grupy związków: koniugaty (dwu i trójskładnikowe) zawierające siderofor i aminokwas oraz analogi strukturalne O-acetylo-L-seryny, potencjalne inhibitory enzymów uczestniczących szlaku syntezy biosyntezy L-metioniny. Badania nad związkami o aktywności przeciwdrobnoustrojowej to od wielu lat jeden z tematów wiodących w grupie badawczej Promotorki rozprawy, prof. dr hab. inż. Marii J. Milewskiej. Fakt ten bez wątpienia ułatwił Doktorantce rozpoczęcie prac i kierunkował Jej zainteresowania naukowe. Należy jednak podkreślić, że zadania badawcze realizowane przez Kandydatkę są w pełni oryginalne, zarówno od strony

koncepcji, jak i zaproponowanych rozwiązań syntetycznych. Wysoko oceniam koncepcję badań a także uzyskane wyniki.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział zatytułowany *Wyniki i dyskusja*, w którym mgr inż. Stefaniak-Skorupa wyjaśnia motywy jakimi kierowała się projektując związki chemiczne o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. W pierwszej części opisuje badania nad koniugatami. Wszystkie zawierają uproszczony siderofor hydroksamowy – ω -*N*-acetylo- ω -*N*-hydroksy-*L*-ornitynę (AHO), jeden z trzech aminokwasów: cispentycynę o działaniu przeciwgrzybowym, *O*-karbamoilo-*D*-serynę (antymetabolit bakteryjny) albo fluorofor (4-cyjanotryptofan, CNTrp), a w wypadku koniugatów trójskładnikowych, także łącznik TML. Ponieważ siderofor jest pochodną aminokwasu (*L*-ornityny), umożliwia to jego kowalencyjne wiązanie zarówno poprzez jego grupę karboksylową (w rozprawie określane jako koniugaty C-terminalne) albo aminową (połączenia *N*-terminalne). W wypadku koniugatów trójskładnikowych, AHO łączony był kowalencyjnie z sideroforem poprzez grupą fenolową, podczas gdy związek transportowany łączony był poprzez grupę karboksylową. Wykorzystując te możliwości Doktorantka zaprojektowała, a następnie zsyntetyzowała 9 koniugatów, w tym 5, w których siderofor i cząsteczka transportowana łączyły się bezpośrednio. Pierwszym etapem Jej badań było otrzymanie odpowiednich składowych koniugatów. Prowadząc wieloetapowe syntezy, Kandydatka korzystała z metod opisanych w literaturze tak je modyfikując, aby otrzymać odpowiednio chronione pochodne. Substratami były powszechnie dostępne związki chemiczne. Wychodząc kwasu *L*-glutaminowego w 7 krokach syntetycznych otrzymała chroniony siderofor. Substratem do syntezy pochodnych 4-cyjanotryptofanu (**10** – z wolną grupą aminową i **11** – z wolną grupą karboksylową) był 4-cyjanoindol, *D*-seryna stanowiła związek wyjściowy do syntezy estru benzyłowego *O*-karbamoilo-*D*-seryny (**19**) a kwas 3-metylo-2-butenowy stanowił prekursor w syntezie łącznika TML. Doktorantka otrzymała także chronione pochodne cispentacyny (związki **12** i **15**). Syntezę koniugatów Kandydatka prowadziła stosując klasyczną metodę w roztworze. Produkty pośrednie wyodrębniała, charakteryzowała i oczyszczała (o ile było to konieczne) metodą chromatografii cieczowej. Drugą klasą związków o potencjalnej aktywności przeciwgrzybowej będącą przedmiotem badań Kandydatki były potencjalne inhibitory enzymów uczestniczących w szlaku biosyntezy *L*-metioniny. W ramach badań otrzymała 5 związków będących analogami strukturalnymi *O*-acylo-*L*-homoseryny, aminokwasu będącego produktem pośrednim w biosyntezie *L*-metioniny. Syntezy wszystkich związków były wieloetapowe, a substratami były *L*-seryna, *L*-homoseryna, *L*-glutamina i Boc- β -chloro-*L*-Ala.

Bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny badań przeprowadzonych przez Kandydatkę. Zaprojektowane, a następnie otrzymane przez Doktorantkę związki chemiczne są

wielofunkcyjne. Wymagało to nie tylko odpowiedniego doboru ortogonalnych grup ochronnych, ale np. konwersji grup hydroksylowych w karboksylowe czy aminowe. Kandydatka z dużym powodzeniem połączyła metody stosowane w syntezie peptydów i w nowoczesnej chemii organicznej. Obecnie prowadzone badania często nakierunkowane na uzyskanie wyniku w jak najkrótszym czasie. Syntezy w roztworze, oprócz niewątpliwie wielu zalet, wymagają bardzo dobrego opanowania warsztatu laboratoryjnego, są też czasochłonne. W tym miejscu chciałbym więc podkreślić nie tylko jakość zaplanowanych i zrealizowanych zadań badawczych, ale też objętość wykonanej pracy. Jak już wspominałem, redakcja rozprawy jest na wysokim poziomie. Doktorantka bardzo klarownie wyjaśnia wybór ścieżek syntetycznych, kompetentnie komentuje uzyskane wyniki, w razie niezadowolających wyników, z powodzeniem wprowadza niezbędne modyfikacje. Lekturę tekstu bardzo ułatwiają czytelne schematy oraz konsekwentna w całej rozprawie numeracja wszystkich syntetyzowanych związków. Nie mam wątpliwości, że mgr inż. Stefaniak-Skorupa bardzo dobrze opanowała warsztat chemika organika. Korekta pracy jest staranna. Poniżej wymieniam dostrzeżone niedociągnięcia. Na rysunku 3.17 we wzorach chemicznych związków **47a** i **47b** powinna być grupa aldehydowa nie karboksylowa. Związki **48a** i **48b** posiadają wolne grupy karboksylowe, łączone więc były odpowiednio ze związkami **15** i **10** a nie **12** i **11** (podobnie w opisie eksperymentów na str. 138). Związek **36** łączony był ze związkiem **10** a nie **11** (str. 70). Na str. 64 zamiast *O*-karbamoilo-D-cykloseryna powinno być *O*-karbamoilo-D-seryna. W kilku miejscach zamiast *cytoplaźmie* powinno być *cytoplazmie* (np. str. 55).

Badania biologiczne syntetyzowanych związków wykonane zostały w Katedrze Technologii Leków i Biochemii. Cztery z otrzymanych koniugatów (**22a**, **25a**, **44a**, **51a**) zawierały znacznik fluorescencyjny w postaci CNTrp. Jak wykazały badania na komórkach grzybów rodzaju *Candida*, ich zdolność do wnikania i akumulacji była zróżnicowana w zależności od badanego szczepu. Najlepsze wyniki uzyskano dla szczepów *C. albicans* i *C. glabrata*. Jak postuluje Doktorantka, obserwowane różnice mogą wynikać z odmiennego systemu transportu sideroforów. Zdaje się to potwierdzać brak penetracji badanych koniugatów komórek bakteryjnych, które nie wykorzystują sideroforów hydroksamowych. W tym miejscu nasuwają się pytania, czy wolny CNTrp penetruje komórkę oraz czy uproszczony siderofor wiąże jony Fe(III)? Być może nawet niezwiązany z jonami żelaza układ sideroforu zachowuje zdolność przechodzenia przez błonę komórkową. Inkubacja koniugatów (**44a**, **44b**, **51a** i **51b**) zawierających łącznik TML z esterazami (wieprzową i obecnymi w ekstrakcie drożdżowym) prowadziła do ich szybkiej proteolizy. Analiza HPLC wspomagana analizą MS wykazała, że zgodnie z założeniem rozpadowi ulegają wiązania estrowe. Do tego fragmentu rozprawy mam kilka pytań. Jak uzasadnić obecność na rys. 3.22 (panel B) jednego piku pochodzącego od

koniugatu **51a**? W syntezie zastosowano mieszaninę racemiczną pochodnej tryptofanu, otrzymano więc koniugat w formie diastereoizomerów, które prawdopodobnie powinny być widoczne na chromatogramie w postaci rozdzielonych pików. Z kolei, w wypadku koniugatów zawierających cispentacynę, ich rozpad prowadził do jej uwolnienia w postaci diastereoizomerów. Doktorantka postuluje, że być może związane jest to z obecnością w bezkomórkowym ekstrakcie *C. albicans* enzymów katalizujących izomeryzację. To ciekawa hipoteza, czy podjęto próbę jej weryfikacji? Koniugaty **22b** i **25b**, w których cispentacyna łączona była z sideroforem wiązaniem amidowym były odporne na działanie bezkomórkowego ekstraktu *C. albicans*. Czy planowane są badania odporności enzymatycznej tych związków na izolowanych proteazach albo w surowicy? Dla czterech koniugatów (**22b**, **25b**, **44b** i **51b**) oznaczono aktywność przeciwdrobnoustrojową. Badania obejmowały ocenę aktywności wobec czterech szczepów rodzaju *Candida* na trzech podłożach. Najwyższą aktywność wykazały koniugaty zawierające łącznik TML (**44b** i **51b**). W wypadku podłoża YNB niezawierającego jonów miedzi i żelaza ich aktywność wyrażona jako MIC₉₀ mM/ml wobec *C. glabrata* i *C. albicans* była wyraźnie wyższa niż oznaczona dla cispentacyny (związek referencyjny). Na podłożu podłożu RPMI-1640 wartości MIC₉₀ były niższe, ale różnice w aktywności w stosunku do CP były jeszcze wyższe. Uzyskane wyniki są bardzo ciekawe. Duża korelacja między aktywnością przeciwgrzybową a obecnością w komórkach grzybów transporterów sideroforów hydroksamowych Sit1/Arn1 potwierdza przyjęte hipotezy badawcze o korzystnym wpływie na aktywność zarówno sideroforu, jak i rozszczepialnego łącznika TML. Wyższa niż związek referencyjny CP aktywność koniugatów **44b** i **51b** na podłożu o składzie zbliżonym do surowicy ludzkiej podnosi potencjalną wartość aplikacyjną tych związków; są one co najmniej atrakcyjnymi strukturami wyjściowymi w dalszych badaniach. Warto podkreślić, że badane koniugaty nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej i cytotoksycznej wobec komórek ssaczy. Szkoda, że w pracy nie zamieszczono zestawienia aktywności przeciwgrzybowej badanych związków z aktywnością powszechnie stosowanych chemioterapeutyków. Wyniki badań aktywności przeciwgrzybowej związków **54** – **58**, potencjalnych inhibitorów szlaku biosyntezy L-metioniny, nie były tak obiecujące. Fosfonowe analogi Ser i HSer (**54** i **55**), postulowane inhibitory transacetylazy L-homoseryny (Met2p), nie hamowały aktywności tego enzymu. Związki **56** i **57** będące strukturalnymi analogami O-acetylo-L-homoseryny oraz zbliżony budową **58** zgodnie z założeniem hamowały aktywność sulfhydrylasy O-acetylo-L-homoseryny (Met15p) oraz γ -syntazy cystationiny (Str2p), niestety aktywność ta nie korelowała z aktywnością przeciwgrzybową. Jedynie naturalnie występujący związek **58** wykazał taką aktywność wobec *C. albicans* i *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ATCC 22019 i *C. dublinensis* CBS 7987. Niestety, obecność Met w składzie podłoża na poziomie niższym niż w

surowicy ludzkiej skutecznie hamuje aktywność związku **58**. Należy podkreślić, że rozczarowujący wynik badań biologicznych nie podważa jakości badań Doktorantki. W ramach rozprawy doktorskiej zaprojektowała ścieżki syntetyczne, a następnie otrzymała pochodne aminokwasów, które mogą zasteć wykorzystane w przyszłych badaniach. Uwaga do opisu badań biologicznych – w rozprawie Doktorantka wymiennie używa określeń *aktywność przeciwgrzybowa* i *aktywność przeciwgrzybicza*.

W ostatnim rozdziale zatytułowanym *Część eksperymentalna*, znajduje się opis eksperymentów prowadzonych przez Kandydatkę oraz szczegółowa charakterystyka fizykochemiczna (analizy ^1H i ^{13}C NMR, wartości oznaczonych temperatur topnienia i skręcalności optycznej oraz ESI-MS) wszystkich syntetyzowanych związków. Część związków wykorzystywano w kolejnych etapach syntezy bez oczyszczania, część oczyszczano metodą chromatografii cieczowej na żelu krzemionkowym. W pracy znajduje się informacja, że w badaniach prowadzono także analizy HPLC, przypuszczalnie w układzie faz odwrótnych (w rozprawie nie znalazłem specyfikacji kolumn HPLC ani warunków ich prowadzenia). Czy taka analiza ograniczyła się do oceny trwałości związków wobec enzymów (podrozdział 3.22)? Moim zdaniem takiej analizie należałoby poddać wszystkie produkty końcowe. Szkoda, że w rozprawie Doktorantka nie zamieściła (np. w suplemencie) przynajmniej przykładowych chromatogramów syntetyzowanych związków, ich widm mas i rozwiązanych widm NMR. Związki badane były w układach biologicznych, jak była ich rozpuszczalność w roztworach wodnych? Reasumując nie mam zastrzeżeń do przedstawionych opisów prowadzonych eksperymentów, które są precyzyjne, umożliwiają czytelnikowi ich powtórzenie. Wyniki analiz fizykochemicznych przekonują o prawidłowości struktur syntetyzowanych związków, a przedstawione uwagi mają charakter polemiczny.

Uważam, że mgr inż. Joanna Stefaniak-Skorupa przedłożyła bardzo interesującą i oryginalną w treści rozprawę doktorską. Po lekturze dysertacji stwierdzam, że Kandydatka jest znakomicie wykształconym chemikiem organikiem, zarówno od strony teoretycznej jak też praktycznej, tym samym jest przygotowana do prowadzenia badań naukowych. Posiada niezwykle pożądane umiejętności łączenia nowoczesnych metod chemii organicznej i chemii peptydów. Temat podjęty przez Doktorantkę, projektowanie nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej jest bardzo ważny z punktu widzenia praktyki medycznej. Do najważniejszych osiągnięć Kandydatki zaliczyłbym otrzymane przez Kandydatkę trójskładnikowe koniugaty z podatnym na działanie esteraz łącznikiem TML o selektywnym działaniu przeciwgrzybowym. Związki te nie przejawiają cytotoksyczności wobec komórek ssaków, a ich niewielkie rozmiary dodatkowo podnoszą potencjalny walor aplikacyjny. Ponadto, opracowane w ramach rozprawy ścieżki syntetyczne, mogą po niewielkich

modyfikacjach zostać wykorzystane w syntezie koniugatów o innym profilu aktywności biologicznej. Kandydatka uzyskała bardzo wartościowe wyniki o czym świadczy między innymi fakt opublikowania części wyników rozprawy w 2 pracach oryginalnych w czasopismach z list JCR oraz 1 w trakcie recenzji.

Reasumując, recenzowana rozprawa doktorska: prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora, wykazuje umiejętność Kandydatki samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym spełnia wymagania ustawowe (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz. U. 2018, poz. 1668) oraz zwyczajowe, dlatego też wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie mgr inż. Joanny Stefaniak-Skorupy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.