

Wrocław, 2022-06-16

Prof. dr hab. Zbigniew Szewczuk, prof. em.
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego
51-612 Wrocław, ul. F. Joliot-Curie 14
e-mail: zbigniew.szewczuk@chem.uni.wroc.pl
tel.: +48-6987-22-113

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Marii Olkiewicz zatytułowanej
„Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych
o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej”**

Antybiotyki są najczęściej stosowanymi lekami przeciwbakteryjnymi we współczesnej terapii, które od dziesięcioleci stanowią podstawową ochronę przed chorobami zakaźnymi i już miliardom ludzi uratowały zdrowie i życie. Odkrycie pierwszego z nich - penicyliny, za które Fleming, Chain i Florey zostali uhonorowani w 1945 roku Nagrodą Nobla, uważa się za najbardziej przełomowe wydarzenie w medycynie XX wieku. Szybko jednak okazało się, że niewłaściwy sposób stosowania antybiotyków doprowadza do stopniowego obniżania ich skuteczności, gdyż wywołuje antybiotykoodporność niektórych szczepów bakterii.

Dlatego w wielu ośrodkach badawczych na świecie prowadzi się intensywne badania nad poszukiwaniem nowych antybiotyków, bardziej skutecznych w działaniu przeciwbakteryjnym i o zminimalizowanych działaniach ubocznych. Mgr Katarzyna Maria Olkiewicz włączyła się w nurt tych badań i pod kierunkiem dr hab. Anny Łęgowskiej, prof. UG wykonała pracę doktorską dotyczącą projektowania i syntezy nowych koniugatów peptydów przeciwdrobnoustrojowych lub penetrujących z flurochinolonami o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Niewątpliwie, tematyka badawcza przedstawiona w pracy doktorskiej pani mgr Katarzyny Marii Olkiewicz jest aktualna i ciekawa zarówno z naukowego jak i utylitarne punktu widzenia. Recenzowana praca doktorska została wykonana w Pracowni Chemii Bioorganicznej Katedry Biochemii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Marii Olkiewicz zawiera 145 stron i składa się z następujących rozdziałów: *Spisu skrótów, symboli i oznaczeń* (4 strony), *Przeglądu literaturowego* (38 stron), oraz *Badań własnych* (64 strony). W rozdziale *Badania własne* przedstawiono *Cel pracy*, opisano przeprowadzone przez Doktorantkę syntezy chemiczne i opisano badania biologiczne oraz przedstawiono uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski wraz z ich podsumowaniem. Rozprawę kończą *Widma MS oraz chromatogramy HPLC otrzymanych peptydów i koniugatów*, spis cytowanej *Literatury* (247 pozycji), *Spis rysunków i tabel*, *Dorobek naukowy* Autorki oraz *Streszczenia rozprawy doktorskiej* w języku polskim i angielskim. Do rozprawy doktorskiej Doktorantka dołączyła płytę CD zawierającą teksty trzech publikacji zawierających opis badań wchodzących zakres recenzowanej pracy doktorskiej.

W pracy zachowana jest właściwa proporcja między częścią literaturową i częścią badawczą. Układ pracy doktorskiej mgr Katarzyny Marii Olkiewicz i struktury podziału treści należy uznać za prawidłowe.

W *Przeglądzie literaturowym* Autorka zamieściła podstawowe informacje na temat antybiotykooporności, omówiła chinolony, a następnie biokoniugaty, ze szczególnym uwzględnieniem koniugatów peptydowych. W dalszej części tego rozdziału Autorka skupiła się na peptydach wykazujących aktywności przeciwdrobnoustrojowe oraz peptydach penetrujących błony komórkowe i naprowadzających na cel terapeutyczny. Rozdział ten zawiera wiele starannie dobranych i aktualnych informacji naukowych, co świadczy o dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki dotyczącej tematyki związanej z jej pracą doktorską, oraz o umiejętności prawidłowego korzystania ze źródeł literaturowych. Tekst *Przeglądu literaturowego* został napisany językiem prostym, przez co będzie zrozumiały dla szerokiego grona czytelników. Rozdział ten zawiera wszystkie informacje niezbędne do wyjaśnienia celu pracy. Wysoko oceniam część literaturową Rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Olkiewicz.

Celem ogólnym recenzowanej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, opracowanie metod syntezy oraz synteza koniugatów peptydowych składających się z chemioterapeutyków należących do rodziny fluorochinolonów: lewofloksacyny lub cyprofloksacyny i wybranych peptydowych fragmentów laktoferyny, katelicydyny

i transportanu. Realizacja tego problemu wymagała opanowania i zastosowania przez Doktorantkę sztuki syntezy organicznej, w tym syntezy peptydów i ich oczyszczania za pomocą metod chromatograficznych. W mojej opinii problem badawczy, którego rozwiązania podjęła się Doktorantka, został poprawnie sformułowany a metody badawcze zostały trafnie dobrane.

Z kolejnych rozdziałów wynika, że badania zostały dobrze przeprowadzone i prawidłowo opisane. Doktorantka przeprowadziła syntezy szesnastu nowych koniugatów peptydowych, które można podzielić na dwie grupy: W pierwszej z nich lek był bezpośrednio związany z peptydem poprzez wiązanie amidowe a w drugiej za pomocą odpowiednich łączników różnej trwałości. Jednak w tekście Rozprawy nie natknąłem się na jasne wytłumaczenie na jakiej podstawie Autorka zaprojektowała struktury chemiczne kolejnych koniugatów. Należy podkreślić, że przeprowadzone przez Doktorantkę syntezy były niebanalne i pracochłonne. Pani mgr Katarzyna Olkiewicz musiała zsyntetyzować niedostępne w sklepach chemicznych pochodne cyprofloksacyny i lewofloksacyny, aby wykorzystać je jako substraty do dalszych syntez na nośniku stałym. Przeprowadzenie wielu syntez wymagało od Doktorantki dużych umiejętności syntetycznych i cierpliwości. W szczególności dotyczyło to syntezy koniugatów zawierających mostek disulfidowy (np. CIP-SS-TP10), gdyż wydajności procesu odszczepiania koniugatu od nośnika stałego nie były satysfakcjonujące, co wymagało racjonalnej optymalizacji tego etapu syntezy. Na podstawie wnikliwej analizy produktów ubocznych powstających podczas tego procesu Doktorantka udoskonaliła procedurę syntezy, co skutkowało znaczącym wzrostem wydajności. Wszystkie otrzymane substancje zostały oczyszczone na preparatywnym chromatografie cieczowym. Ich czystość została potwierdzona za pomocą RP-HPLC a tożsamość za pomocą MALDI-MS. W recenzowanej Rozprawie doktorskiej Autorka zamieściła chromatogramy HPLC i widma MS wszystkich zsyntezowanych związków chemicznych. Wysoko oceniam część syntetyczną pracy doktorskiej pani mgr Katarzyny Olkiewicz.

Badania biologiczne otrzymanych przez Doktorantkę koniugatów peptydowych i ich składowych zostały wykonane przez pracowników zespołu prof. Sławomira Milewskiego w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego

Politechniki Gdańskiej. Wprawdzie Autorka Rozprawy nie napisała czy uczestniczyła w tych badaniach, lecz dokładnie je opisała i przedstawiła otrzymane wyniki. Liczba przeprowadzonych testów biologicznych była bardzo duża. Zbadano aktywności przeciwbakteryjne i przeciwgrzybowe otrzymanych koniugatów i ich składowych oraz trwałość koniugatu CIP-SS-TP10 w komórkach *Staphylococcus aureus*. Przeprowadzono badania zdolności bakterii do wytwarzania oporności na działanie wybranych koniugatów i cytotoksyczności wybranych związków względem komórek ssących, jak również zdolności takich komórek do wytwarzania reaktywnych form tlenu po inkubacji z wybranymi koniugatami. Ponadto przeprowadzono ocenę właściwości hemolitycznych badanych związków, oraz zdolności wybranych związków do przenikania do wnętrza drożdżaków *Candida* i hamowania działania topoizomerazy II.

Wprawdzie Autorka napisała, że eksperymenty wykonywano w trzech niezależnych próbach, lecz wskazane byłoby podanie informacji, czy otrzymane wyniki badań były powtarzalne. Autorka przedstawiła uzyskane wyniki badań biologicznych w tabelach i wykresach, prawidłowo je zinterpretowała i wyciągnęła ciekawe wnioski. Okazało się, że większość badanych koniugatów wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Do najbardziej ciekawego rezultatu badań biologicznych zaliczyć należy odkrycie silnej aktywności przeciwgrzybowej koniugatów transportanu 10 (CIP-TP10 i CIP-SS-TP10), przy jednoczesnym braku właściwości grzybobójczych składowych tych koniugatów.

W mojej opinii, uzyskane przez Doktorantkę wyniki wykonanych badań są wartościowe i oryginalne, a cel pracy został osiągnięty. Autorka wykazała się krytycznym sposobem interpretowania rezultatów badań i ostrożnym wyciąganiem wniosków. Należy podkreślić, że część z wyników prac badawczych wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Olkiewicz została już opublikowana w trzech bardzo dobrych pracach naukowych i przedstawiona na kilkunastu konferencjach naukowych.

Rozprawa została napisana na ogół poprawnym językiem. Na pochwałę zasługuje jej estetyczny wygląd. Znalazłem jednak sporo drobnych błędów literowych i nietrafnych

sformułowań. W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag. Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej niektóre z nich:

Str. 6. Spis treści zawiera błędy.

Str. 57. Proszę o wyjaśnienie, na jakiej podstawie Autorka uważa, że koniugat CIP-SS-TP10 posiada wewnątrzcząsteczkowe wiązanie disulfidowe.

Str. 57. We wzorze koniugatu CIPC-CTP10 jest błąd.

Str. 60. Nazwy „*N,N'*-diizopropylloetyloamina” oraz „*N,N'*-dimetyloformamid” są niepoprawne, gdyż sugerują, że cząsteczki tych amin zawierają po dwa atomy azotu.

Str. 69. Niezrozumiałe jest zdanie: *”Po tym czasie, oddestylowałam rozpuszczalnik, suchą pozostałość zadalam kilkukrotnie eterem dietylowym w celu usunięcia nieprzereagowanego HOSu a następnie z liofilizowałam z wody.”* Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób kilkukrotne zadanie suchej pozostałości eterem dietylowym mogłoby usunąć nieprzereagowany HOSu.

Powyższe uwagi i pytania nie podważają wartości merytorycznej rozprawy i nie wpływają na moją pozytywną ocenę tej pracy.

Z uznaniem odnoszę się do pracowitości Doktorantki i jej dobrego opanowania warsztatu pracy w zakresie syntezy koniugatów peptydowych. W moim przekonaniu rozprawa doktorska mgr Katarzyny Marii Olkiewicz zatytułowana *„Projektowanie i synteza koniugatów peptydowych o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej”* stanowi cenny wkład naukowy i spełnia wszystkie wymagania określone w Ustawie o stopniach i tytule naukowym. Dlatego stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Marii Olkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2. *Recenzent*