



WYDZIAŁ  
CHEMII

Uniwersytet Łódzki

Łódź, 13 sierpnia 2022r.

Dr hab. Marcin Jasiński, prof. UŁ  
Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii  
Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej  
ul. Tamka 12, 92-403 Łódź  
Tel (+48)(42) 635 57 66

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Julii Krzywik**  
**pt. „Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena właściwości przeciwnowotworowych**  
**nowych pochodnych kolchicyny”**

Systematyczna modyfikacja struktury związków naturalnych o udokumentowanej aktywności biologicznej oraz następcza analiza relacji struktura-właściwości stanowi jedną z ważniejszych metod poszukiwania nowych połączeń organicznych o pożądanym właściwościach. W ten sposób postępowania wpisuje się przedłożona do recenzji dysertacja Pani mgr inż. Julii Krzywik, która zorientowana jest na syntezę i zbadanie serii pochodnych kolchicyny – znanego produktu naturalnego stosowanego z wyboru m.in. w przypadkach ostrych stanów dny moczanowej – zaprojektowanych pod kątem uzyskania nowych materiałów cytotoksycznych. Badania zrealizowano w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Doktorat wdrożeniowy” pod opieką naukową prof. dr hab. Adama Huczyńskiego (Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) przy współudziale łódzkiej firmy Trimem Chemicals (opiekunem pomocniczym był mgr inż. Witold Mozga). Tytułowe badania wykonane przez Doktorantkę stanowią logiczne rozwinięcie prac badawczych zrealizowanych wcześniej w Zespole promotora, a punktem wyjścia jest obserwacja, że wymiana grupy metoksylowej (OMe) w pozycji C(10) kolchicyny na grupę metyloaminową (NHMe) istotnie zwiększa cytotoksyczność związku. W tym kontekście, Autorka podjęła próbę zbadania, w jaki sposób dalsza transformacja w obrębie występującej natywnie w pozycji C(7) grupy acetyloaminowej wpłynie na aktywność docelowych, podwójnie modyfikowanych pochodnych kolchicyny. Choć od niemal dwóch dekad obserwuje się wzmożone zainteresowanie syntetycznymi analogami kolchicyny ze strony wiodących ośrodków badawczych (przede wszystkim w kontekście zastosowań w problemach sercowo-naczyniowych), podjęty przez

Doktorantkę kierunek badań cechuje oryginalność, a także poprawność założeń badawczych oraz wyraźnie użyteczny charakter spodziewanych wyników.

Na podstawie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Julii Krzywik opracowanej według formy przewidzianej znowelizowaną ustawą składa się cykl pięciu spójnych tematycznie publikacji oryginalnych (eksperymentalnych), jak również dwa patenty RP będące pokłosiem powyższych prac badawczych, potwierdzające oczekiwany wdrożeniowy charakter zebranych wyników. Wspomniane artykuły oryginalne ogłoszono drukiem w latach 2020-2021 w renomowanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (z tzw. *listy filadelfijskiej*) o dobrym lub bardzo dobrym współczynniku wpływu. I tak, dwie pierwsze prace opublikowano w *Molecules* (MDPI), dwie kolejne w *European Journal of Medicinal Chemistry* oraz *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (obie z wydawnictwa Elsevier), a ostatnią z nich wydano w *ACS Omega* (ACS). Są to tytuły dobrze rozpoznawane w środowisku chemików pracujących w obszarze syntezy organicznej i chemii medycynej, publikujące wartościowe doniesienia naukowe. Pod względem parametrów scjentometrycznych powyższy dorobek publikacyjny wyraża się w sumarycznym współczynniku  $IF \approx 21.5$  oraz 560. punktach MEN według aktualnego wykazu czasopism (z dn. 1 grudnia 2021r.).

Zasadnicze elementy rozprawy doktorskiej mgr inż. Julii Krzywik to: i) rzeczowe *wprowadzenie* do podjętej tematyki, w którym Autorka koncentruje się na najważniejszych aspektach i celach podjętych badań w świetle aktualnych wyzwań dotyczących terapii chorób nowotworowych, a także stanu wiedzy na temat wybranego obiektu badań – kolchicyny i jej pochodnych opisanych w literaturze fachowej, postulowanego mechanizmu aktywności przeciw-proliferacyjnej etc. oraz ii) zwięzłe *omówienie wyników badań* zebrane na dwudziestu ośmiu stronicach typowego formatu (A4) będące komentarzem do wyników własnych Doktorantki z obszaru syntezy i charakterystyki spektroskopowej, jak również do efektów badań biologicznych *in vitro* uzyskanych związków, pomiarów rentgenograficznych pochodnych krystalicznych oraz dokowania molekularnego *in silico* zrealizowanych we współpracy z pracownikami innych ośrodków badawczych. Istotnym dopełnieniem całości są przedruki wszystkich prac i patentów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej wraz z materiałami dodatkowymi (tzw. Supporting Information), a także jednostronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim, podsumowanie, spis bogato cytowanej literatury, wykaz dorobku naukowego Autorki oraz oświadczenia współautorów. Lektura załączonych oświadczeń jednoznacznie potwierdza znaczącą rolę Doktorantki nie tylko w realizacji zadań z obszaru syntezy organicznej i w pracach mających na celu potwierdzenie struktury wyizolowanych związków, ale również częściowo w interpretacji wyników badań biologicznych, przygotowaniu manuskryptów publikacji i niezbędnych prac redakcyjnych. Nie dziwi zatem fakt wysokiego procentowego udziału Doktorantki we wskazanych publikacjach (40-65%), w których jest pierwszym autorem, a w przypadku patentów – jedyną osobą wskazaną jako twórca wynalazku. Warto również podkreślić pozostałą działalność naukową Pani mgr inż. Julii Krzywik udokumentowaną m.in. współautorstwem

kolejnych trzech publikacji (w tym dwóch o zasięgu międzynarodowym) oraz aktywną promocją uzyskanych wyników na kilkunastu konferencjach krajowych i międzynarodowych (w tym w formie czterech komunikatów ustnych) za które była nagradzana na konferencjach dedykowanych doktorantom (np. I miejsce za plakat naukowy na XIV. Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim 2021 oraz II miejsce w sesji wystąpień ustnych na II. Interdyscyplinarnej Konferencji Doktorantów Uczelni Medycznych DOC UMED 2021). Ponadto, Doktorantka pełniła rolę wykonawcy przynajmniej trzech projektów badawczych, m.in. finansowanego przez NCBiR oraz projektu Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Łódzkiego.

Pod względem merytorycznym, wyniki opisane w przedłożonej do oceny dysertacji nie budzą zastrzeżeń. Jako kluczowy substrat do syntezy podwójnie modyfikowanych związków docelowych Autorka wskazała łatwo dostępną pochodną kolchicyny zawierającą w pozycji C(10) podstawnik MeNH-, a na atomie węgla stanowiącym centrum stereogeniczne (tj. pozycja C(7)) grupę aminową -NH<sub>2</sub> otwierającą szeroki wachlarz możliwości dalszej funkcjonalizacji cząsteczki grupami bioizosterycznymi względem natywnej grupy acetyloaminowej. Ten potencjał Doktorantka sprawnie wykorzystała przygotowując serię ponad 60 nowych pochodnych z grupy amidów i sulfonamidów, otrzymywanych poprzez reakcje z odpowiednimi chlorkami kwasowymi lub kwasami karboksylowymi w obecności EDCI jako odczynnika sprzęgającego (*Molecules* **2020**, 1789), amin uzyskiwanych przede wszystkim w reakcji aminowania redukcyjnego z użyciem odpowiednich reagentów karbonylowych i NaBH<sub>3</sub>CN jako reduktora (*Molecules* **2020**, 3540), karbaminianów i tiokarbaminianów dostępnych odpowiednio, w reakcjach z chloromrówczanami oraz w dwuetapowej reakcji polegającej na generowaniu *in situ* izotiocyanianu pochodnego kolchicyny (ten otrzymywano w reakcji z tiofosgenem) i jego następczym wyłapaniu alkoholanem (*Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 215, 113282). W kolejnej pracy (*Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2021**, 47, 128197) ten sam prekursor posłużył jako reagent nukleofilowy do syntezy kolejnej serii analogów, tym razem mocznikowych, tiomocznikowych i guanidynowych. Oprócz powyżej wspomnianych standardowych metod syntezy wykorzystujących ugrupowanie aminowe, w trakcie realizacji projektu Doktorantka przygotowała niezbędne substraty niedostępne komercyjnie (np. aldehydy w reakcjach utleniania alkoholi), jak również przeprowadziła szereg transformacji grup funkcyjnych w produktach (m.in. w reakcjach addycji typu Michaela), potwierdzając tym samym wysokie umiejętności w obszarze syntezy organicznej.

Mimo że powyższych syntez nie optymalizowano, spodziewane produkty z reguły wydzielano z przyzwoitą wydajnością umożliwiającą wykorzystanie związków w dalszych badaniach, a struktury produktów Autorka ustaliła w oparciu o pomiary spektrometrii mas (LC-MS) oraz spektroskopię NMR (<sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C-). Załączone do rozprawy kopie widm NMR w znakomitej większości przypadków potwierdzają wysoką spektroskopową czystość uzyskanych próbek, które rutynowo izolowano w oparciu o metody chromatografii kolumnowej. Z nieznanymi mi powodów, Autorka zrezygnowała

z pełnej charakterystyki produktów; dotyczy to m.in. braku pomiarów temperatury przejść fazowych (t.t.) dla materiałów krystalicznych, uzupełniających pomiarów spektroskopii w podczerwieni (często przydatnych w analizie grup funkcyjnych) oraz sprawdzenia czystości wyizolowanych produktów analizą spaleniwą. Szczególnie ten ostatni pomiar dokumentujący analityczną czystość próbki (jeśli zgodny z oczekiwaniem) stanowi doskonały marker warsztatu chemika syntetyka.

Kolejny wątek w badaniach zrealizowanych w ramach pracy doktorskiej dotyczył syntezy serii kilkudziesięciu pochodnych z grupy 1,2,3-triazoli (*ACS Omega* **2021**, *6*, 26583), uzyskiwanych w wyniku (3+2)-cykloaddycji azydku pochodnego kolchicyny z wybranymi alkinami. Dostęp do tego pierwszego Doktorantka uzyskała wychodząc z wcześniej stosowanej aminy w reakcji transferu grupy diazowej przy wykorzystaniu chlorowodoru azydku imidazolo-1-sulfonylowego. Reakcje formalnej (3+2)-cykloaddycji azydku prowadzono w standardowych warunkach reakcji Huisgena-Meldala-Sharplessa, w obecności generowanych *in situ* jonów miedzi(I), przy użyciu CuSO<sub>4</sub> i askorbinianu sodu. W komentarzu do tego wątku zabrakło mi krótkiej dyskusji nt. mechanizmu i pełnej regioselektywności wykorzystywanej transformacji. Nie jest również jasne, z czego wynikała konieczność zmiany układu katalitycznego (Cu/DIPEA) w reakcjach bardziej oleofilowych acetylenów (1-pentynu oraz 1-heksynu) i w odniesieniu do tej kwestii poproszę o krótki komentarz w trakcie obrony.

Badania w obszarze syntezy organicznej i analizy spektroskopowej zrealizowane przez mgr inż. Julię Krzywik stanowiły kluczowy etap bardziej zaawansowanego projektu multidyscyplinarnego mającego na celu poszukiwanie nowych chemioterapeutyków. Z tego powodu, istotnym elementem *omówienia wyników* jest komentarz Autorki na temat dostarczonych analiz aktywności biologicznej. W tej części sprawnie przedyskutowała trendy cytotoksyczności otrzymanych związków wobec wybranych linii komórkowych (były to ludzkie komórki nowotworu płuc A549, piersi MCF7 oraz jelita grubego LoVo) w odniesieniu do aktywności związków referencyjnych (doksorubicyna i cisplatyna), a także selektywności względem linii prawidłowych (BALB/3T3) oraz aktywności wobec lekoopornej względem doksorubicyny linii nowotworu jelita grubego LoVo/DX (mierzonej tzw. *Resistance Index*). W oparciu o te analizy, Doktorantka wyselekcjonowała najbardziej obiecujące struktury jako kandydatów do ewentualnych dalszych badań. Zgadzam się z Autorką, że jeden z bardziej atrakcyjnych kierunków może dotyczyć dalszych modyfikacji pochodnej z serii aminowej sfunkcjonalizowanej na atomie azotu ugrupowaniem 2-chlorobenzylowym (oznaczonej w pracy numerem II-14), która wykazywała wysoką aktywność antyproliferacyjną wobec wszystkich testowanych linii nowotworowych (w stężeniach nM) oraz bardzo dobre (w przypadku LoVo na poziomie 2 rzędów wielkości) lub umiarkowane selektywności (SI > 3 w pozostałych przypadkach). Inny ciekawy wątek dalszych badań może dotyczyć bardziej systematycznego wprowadzania atomów fluoru bądź grup fluoroalkilowych zarówno do cząsteczki kolchicyny, jak i jej 10-metyloaminowego analogu.

Komentarz do rozprawy doktorskiej mgr inż. Krzywik jest napisany dobrą polszczyzną, z dużą dbałością o detale oraz jakością prezentowanych grafik i schematów. Nieliczne usterki edycyjne, z których wybrane z obowiązku recenzenta zgłaszam poniżej, w najmniejszym stopniu nie odbierają przyjemności w lekturze opracowania. Powyższa uwaga dotyczy np.: i) nazwy pierścienia A kolchicyny, którego poprawne wersje to trimetoksyfenyloxy lub odpowiednio –benzenowy, a nie –fenolowy [str. 24], ii) przyjętego w literaturze fachowej sposobu prezentacji numerów związków wymienionych z nazwy tj. numery powinny być podane w nawiasach [np. str. 31], iii) umieszczenia jednej ze stron przedruku publikacji 'do góry nogami' [str. A-III-s5] etc. Z drugiej strony, Autorka zastosowała w pracy bardzo ciekawy sposób numeracji związków polegający na zachowaniu numeracji z opublikowanych prac, dodatkowo opatrzonej rzymską cyfrą wskazującą na konkretną publikację (od I do V). Takie rozwiązanie jest nie tylko bardzo przydatne w lekturze tekstu (i w pracy recenzenta) ale sprawia zarazem, że komentarz-przewodnik Autora po rozprawie oraz publikacje stanowiące jej podstawę stają się spójną całością. Kolejnym pomysłowym rozwiązaniem jest prezentacja rozbudowanych schematów na rozkładanych stronicach, umożliwiającymi szybki przegląd dużej liczby wykonanych syntez, tu ukazanych w formie dużej 'mapy reakcji'.

W podsumowaniu stwierdzam, że badania przedstawione w rozprawie dotyczą aktualnej i bardzo ważnej z punktu widzenia możliwych praktycznych zastosowań tematyki oraz że zostały zrealizowane w oparciu o adekwatny warsztat badawczy. Kandydatka do stopnia naukowego doktora zaprezentowała bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu i wiedzę w studiowanym obszarze, a także umiejętność krytycznej oceny uzyskanych wyników, również tych dostarczonych przez współpracowników Zespołu. Liczba uzyskanych podwójnie modyfikowanych związków docelowych oraz uprzednio przygotowanych prekursorów niezbędnych do ich syntezy jednoznacznie potwierdza pracowitość Doktorantki. W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr inż. Julii Krzywik pt. *'Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena właściwości przeciwnowotworowych nowych pochodnych kolchicyny'* spełnia warunki określone w *Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku 'Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce'* i z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie mgr inż. Julii Krzywik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

