

Dr hab. Danuta Branowska

Siedlce, 06.09.2017 r.

Zakład Chemii Organicznej

Wydział Nauk Ścisłych

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Arlety Sierakowskiej
„**Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena aktywności biologicznej nowych pochodnych kofeiny**” przedstawiona Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

1. **Ocena strony formalnej pracy doktorskiej**

Praca doktorska Pani magister Arlety Sierakowskiej została wykonana pod opieką Pani prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Rozprawa została przygotowana w formie monografii i dotyczy syntezy, charakterystyki oraz badań właściwości nowych substancji o potencjalnej aktywności biologicznej.

Dysertacja przedstawiona mi do oceny składa się z części wstępnej, mającej charakter przeglądu literaturowego przeprowadzonego pod kątem właściwości biologicznych alkaloidów a w szczególności kofeiny: metod syntezy, metabolizmu i aktywności biologicznej, określonego celu pracy, narracyjnego opisu badań przeprowadzonych przez Doktorantkę, opisu syntez, badań aktywności biologicznej, przeprowadzonych metod badawczych, podsumowania i spisu literatury. Ponadto praca zawiera osobno załączony spis tabel, publikacji i dorobku naukowego a także załączniki z danymi krystalograficznymi, schematy prowadzonych reakcji i odbitkę publikacji.

W pracy liczącej 164 stron tekstu, wprowadzenie wraz z przeglądem literaturowym zajmuje 30%, opis badań wraz z wnioskami 39%, a dokumentacja eksperymentalna zajmuje 31%. Z przedstawionego zestawienia widać wkład w dyskusję nad uzyskanymi wynikami jaki został przeprowadzony przez autorkę. W opracowaniu rozprawy wykorzystano 272 odnośniki literaturowe z których 231 pozycji jest zamieszczonych w części teoretycznej pracy co zasługuje na podkreślenie i widoczne zaangażowanie doktorantki w opracowanie tej części. Łączny, obejmujący tematykę dysertacji (w dziedzinie alkaloidów) dorobek naukowy doktorantki stanowi 3 oryginalne artykuły, z czego jeden w prestiżowym czasopiśmie *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters* o IF =

2.454, dwa pozostałe artykuły opublikowane zostały w materiałach konferencyjnych z Ogólnopolskiego Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce nowe wyzwania i możliwości” o nieznannej ilości stron co doktorantka pozwoliła sobie pominąć. Ponadto w spisie dorobku naukowego podane są publikacje wysłane do druku, brak jest jednak informacji na temat tytułów tych czasopism.

Tytuł pracy jest ogólny i mówiący o typie związku, który jest przedmiotem dysertacji Pani magister Arlety Sierakowskiej. Natomiast tytuły poszczególnych rozdziałów są bardziej szczegółowe i zawierają precyzyjny opis o charakterze narracyjnym ciągu prac eksperymentalnych, syntez trzech grup związków: siarkowych, di- i poliaminowych oraz jak to nazwała autorka „zmodyfikowanych pochodnych kofeiny” w postaci imidów i amidów oraz sprzężonych alkadienów. Wszystkie opisane związki w większości otrzymano po raz pierwszy chociaż brak jest informacji na temat optymalizacji warunków prowadzonych procesów. Tytuł pracy uważam za odpowiedni i adekwatny do wiadomości merytorycznych zawartych w omawianej pracy jak i przeprowadzonych eksperymentów. Ogólnie mogę stwierdzić, że wybór obiektów badań był trafny z punktu widzenia badania syntezy pochodnych kofeiny. Jak należało oczekiwać, istotą powodzenia w tak zarysowanym temacie badawczym jest dobre opanowanie metod eksperymentalnych w obszarze wymagającym solidnego warsztatu chemicznego. W mojej ocenie, biorąc pod uwagę jakość i rozmiar wykonanej pracy, magister Arleta Sierakowska sprostała trudnościom postawionego jej zadania.

2. Ocena zawartości merytorycznej pracy:

Wybór tematu pracy i jej zakres są interesujące i stanowią doskonałe źródło inspiracji z obszaru zainteresowań Pani profesor Beaty Jasiewicz – promotora tej pracy, której badania wpisują się w ogólnoswiatową tendencję poszukiwania nowych związków aktywnych biologicznie z grupy alkaloidów.

Alkaloidy należą do związków heterocyklicznych o charakterze zasadowym. Popularność tych układów jest wynikiem ich różnorodnej aktywności biologicznej i stanowi przedmiot badań wielu naukowców. Autorka w części literaturowej omawia zagadnienia, które uznała za najważniejsze z punktu widzenia tematyki samej pracy. Szerokie spektrum farmakologiczne alkaloidów zostało przedstawione przez doktorantkę w rozdziałach od 2.3.5 do 2.6, gdzie kofeina pełni rolę antagonisty receptorów adenozynowych, inhibitora oksydazy aminowej i wykazuje aktywność przeciwnowotworową, antybakteryjną i przeciwgrzybiczą.

W celu potwierdzenia ważności wyboru tematyki dysertacji chciałabym uzupełnić swoją opinię danymi z bazy Web of Science. Pod hasłem „caffeine” występuje ponad 32 tys. pozycji z czego ponad 13 tys. przypada na ostatnie dziesięciolecie z tendencją wzrostową w ostatnich latach od 957 do 1598 w 2016 roku i już z liczbą 918 publikacji w 2017 roku. Artykuły są interdyscyplinarne obejmujące nauki: eksperymentalne, chemię organiczną, analityczną, biologię molekularną, farmację, farmakologię, chemio- i bioinformatykę.

Fragment zatytułowany „Dyskusja wyników” jest dla mnie bardzo interesujący, a w szczególności część eksperymentalna. Jest to najistotniejsza część rozprawy, której logika utrzymana jest w rytmie rozwoju projektu badawczego. W każdym z poszczególnych rozdziałów opisane są zamiary, oparte na podstawach literaturowych lub wynikach poprzedzających syntezę, sposobie ich realizacji, opisie efektów w kategoriach: reakcja – produkt wraz z metodami izolacji i charakteryzacji produktu, aktywność biologiczna poparta obliczeniami teoretycznymi, wnioski końcowe i implikacje dla dalszych badań.

Część badawczą autorka rozpoczęła od siarkowych pochodnych kofeiny, co nie było trudne do przedstawienia ze względu na fakt opublikowania tych danych w publikacji autorki z 2016 w *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* Bardzo enigmatycznie autorka wspomina, iż związki: 6-tiokofeina (**2**) jak i 2,6-ditiokofeina (**3**) są znane w literaturze, ale nie zostały szczegółowo scharakteryzowane. Chciałabym dowiedzieć się więcej na temat różnic wynikających z syntez tych związków. Dlaczego autorka w związku z tym nie dokonała pomiarów MS wysokiej rozdzielczości czy też analizy elementarnej potwierdzającej czystość otrzymanych produktów. Na uwagę zasługuje fakt, że dla czterech związków z grupy siarkowych analogów wykonano strukturę krystalograficzną potwierdzając tym samym zaprojektowane produkty reakcji.

Niewątpliwie do pozytywnych rezultatów rozprawy należą reakcje tworzenia di- i poliaminowych pochodnych kofeiny. W tej części doktorantka przeprowadziła syntezę 16 nowych związków. Jestem pełna podziwu dla jej zdolności eksperymentatorskich bo są to związki polarne, których oczyszczanie z tej przyczyny jest trudne. W tym miejscu chciałabym by doktorantka przedstawiła trochę więcej szczegółów tworzenia tych pochodnych chociażby ze względu na fakt rozbieżności opisu w pracy. Na stronie 66 doktorantka pisze iż „surowe produkty przekrystalizowała uzyskując związki 11-27 z wydajnościami 70 %”. Po takim sformułowaniu spodziewałam się produktów w postaci krystalicznej co jednak nie jest zupełną prawdą. Na stronie 121 już w części eksperymentalnej autorka pisze, że pochodne 11-15 otrzymała w postaci proszków,

natomiast nie wspomina w jaki sposób otrzymała czystość analityczną pozostałych produktów 16-27, które okazały się być olejami. Godne uwagi jest podkreślenie olbrzymiego zaangażowania się doktorantki w interpretację widm MS wszystkich pochodnych aminowych co przyczyniło się do powstania publikacji, którą autorka wysłała do druku. Czuję jednak pewien niedosyt wynikający z braku schematu i podsumowującej tabeli, przebiegu fragmentacji dla związków 23-27 przez analogię do wcześniejszych opisów.

Trzecią grupą syntezowanych związków przez mgr Arletę Sierakowską są modyfikowane pochodne diaminowe. I tutaj oczekuję odpowiedzi i wyjaśnienia doktorantki, dlaczego modyfikację związków przeprowadziła tylko dla pochodnych 11-13, jakimi regułami wyboru się kierowała? Układy te nie wykazują wyjątkowej aktywności biologicznej ani w testach przeciwrakowych (na linie komórek raka MCF-7) co również wynika z analizy farmakokinetycznej. Jedynym ich atutem jest 80 % wartość aktywności protekcyjnej związku referencyjnego jakim jest Trolox i jest ponad 2.5 razy większa niż wartość aktywności protekcyjnej BHT - 2,6-bis(1,1-dimetyloetylo)-4-metylofenol względem erytrocytów ludzkich poddanych działaniu AAPH - dichlorowodorek 2,2'-azobis-2-amidinopropan. Analogiczne pytanie nasuwa się dla reakcji z bezwodnikami, dlaczego prowadzono reakcję z maleinowym, octowym oraz ftalowym otrzymując zamierzone produkty 28-39 z których tylko *N*-podstawione pochodne ftalimidu wykazują aktywność biologiczną zarówno na podstawie doniesień literaturowych a także co można było się domyśleć przez analogię w wyniku testów *in vitro* otrzymanych przez doktorantkę.

Grupa pochodnych alkadienowych została otrzymana w wyniku uzyskanych doświadczeń przez doktorantkę z pobytu w zespole prof. Petrilli'ego we Włoszech. Tworzone tego typu pochodne, są czynnikami interkalującymi o właściwościach przeciwrakowych w zwalczaniu między innymi raka piersi czy żołądka. Doktorantka do przeprowadzenia tych syntez wybrała diaminy o symbolach 24-27, również nie tłumacząc takiej decyzji, chociaż w tym wypadku analiza farmakokinetyczna wypadła dla tych właśnie związków najkorzystniej. Tworzenie tych pochodnych jest procesem dwuetapowym w konsekwencji prowadząc do struktur 40-43 (ostatni jest olejem, chociaż doktorantka wykonywała krystalizację) oraz 44 w postaci dimeru gdy zastosowano 3,4-dinitrotiofen jako reagent. Tworzenie dimerycznego produktu jest wynikiem obecnych, najbardziej reaktywnych pozycji α w pierścieniu tiofenu.

Dla wszystkich związków doktorantka przeprowadziła analizę spektroskopową, nie jest ona pełna na co już wcześniej zwróciłam uwagę. W szczególności brak jest analizy elementarnej lub spektroskopii masowej wysokiej rozdzielczości a w niektórych przypadkach ^{13}C NMR. Większość czasopism naukowych wymaga tych danych spektroskopowych. Mimo ich braku, interpretacja widm nie budzi większych zastrzeżeń, jednak dziwi fakt, że przy analizie związków o bardziej skomplikowanej budowie nie wykonano żadnych widm dwuwymiarowych, które pozwoliłyby na przypisanie sygnałów z większym prawdopodobieństwem. W interpretacji widm ^1H NMR brak jest ponadto stałych sprzężenia dla określonych multipletów - tripletów co doktorantka sukcesywnie pomija w całej części eksperymentalnej.

Znaczna część badań własnych doktorantki dotyczy badań aktywności biologicznych. Właściwości cytotoksyczne zostały przeprowadzone w testach *in vitro*. Hemolitycznej aktywności oraz oporności osmotycznej erytrocytów poddano wszystkie pochodne kofeiny. Dodatkowo sprawdzono ich właściwości antyoksydacyjne. Odnośnikiem do wspomnianych badań był Trolox i DPPH - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazol. I tutaj doktorantka ma powód do zadowolenia. Większość otrzymanych układów charakteryzuje się właściwościami protekcyjnymi wyższymi niż standardowy BHT - 2,6-bis(1,1-dimetyloetylo)-4-metylofenol). A niektóre pochodne np. o symbolu 10 jest porównywalna z aktywnością Troloxu a przewyższa ponad dwukrotnie aktywność BHT jak wspomniane już wcześniej związki 11, 13 czy 29 i większość pochodnych kofeiny.

Testy badań właściwości przeciwgrzybiczych i antybakteryjnych przyniosły także zadowalające rezultaty. Na szczególną uwagę zasługuje związek 10 dla którego największe strefy zahamowania wzrostu bakterii tlenowych zaobserwowano w stosunku do Gram dodatnich szczepów: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, oraz Gram dodatnich próchnicznych: *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus mutants* i Gram ujemnych *Escherichia coli*. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na interdyscyplinarność badań, do których doktorantka dodała jeszcze metody obliczeniowe. Tabelaryczna analiza farmakokinetyczna przy użyciu metod *in silico*, jest doskonałym potwierdzeniem i oceną przydatności syntezowanych związków jako potencjalnych leków. Dyskusja wyników jest wielowątkowym opisem celów ocenianej pracy. Analizując te dane można ogólnie stwierdzić iż wszystkie związki spełniają warunki ich biodostępności gdyż uzyskane wartości spełniają tzw. regułę Lipińskiego. Jednak przy głębszej analizie z uwzględnieniem konkretnych danych np. współczynnika podziału ($\log P$) czy też wartości powierzchni polarnej można zawęzić liczbę aktywnych potencjalnie związków, co

doktorantka czyni w podsumowaniu. Te najbardziej istotne parametry umożliwiają wyróżnić tylko kilka z nich, i są to diaminowe pochodne o symbolach 26 i 27 oraz produkty z podstawnikiem ftalowym. Spośród wielu deskryptorów możliwych do uwzględnienia w obliczeniach teoretycznych: strukturalnych, termodynamicznych, elektronowych, geometrycznych i topologicznych autorka wzięła pod uwagę tylko kilka z nich, stanowiących regułę Lipińskiego.

Najmniej zrozumiały jest dla mnie fragment obliczeń teoretycznych, w których autorka bada stabilność termodynamiczną większości otrzymanych struktur. Ta część jest napisana skomplikowanie i zawile. Właściwość ta była sprawdzana w procesie równowagowania, poprzedzona symulowanym wyżarzaniem. Istotnym czynnikiem określającym tę cechę jest wartość współczynnika RMSD. Zestawienie takich danych znacznie ułatwia identyfikację odpowiednich struktur, ale brakuje głębszych wniosków potrzeby takich symulacji. Brak jest spójności wyników w obrębie prowadzonych doświadczeń oraz trudne do skomentowania i uogólnienia rezultaty.

Nieoceniona jest rola Pani magister Arlety Sierakowskiej wniesiona w badanie aktywności farmakologicznej ugruntowanej podstawami dynamiki molekularnej. Widoczny jest logiczny związek pomiędzy poszczególnymi multidyscyplinarnymi badaniami i chociaż hipoteza biodostępności metodą *in silico* nie potwierdziła w pełni badań eksperymentalnych, to nadal uważam iż całość pracy jest spójna i wnosi istotny wkład w obszarze badań nad pochodnymi kofeiny.

Chciałabym jeszcze zwrócić uwagę na niektóre niedociągnięcia zauważone w pracy:

- rys. 3; strzałka tam wprowadzona jest zarezerwowana dla retrosyntezy
- Schemat 3 strona 13 brak opisu w tekście do symboli wprowadzonych na schemacie (I, II i III)
- oczywiście nie jest to błędem ani też wymogiem, ale lepiej się czyta pracę chemiczną z uwzględnionymi reakcjami, dotyczy to strony 14 na której obecny jest tylko opis metody syntezy kofeiny z mocznika
- strona 19 jest „działaniem mioloicznym” powinno być miotolityczne
- strona 26 Schemat 13 opis dotyczy rodników tlenowych natomiast na schemacie są zapisane tylko jony
- strona 47 zapis nie dotyczy kompleksów XXX, XXXI i XXXII ale XXVIII, XXVIX i XXX zgodnie z rysunkiem 36.
- strona 67 Schemat 13 związek pod numerem 16 $R = -(CH_2)_2(C_3H_3N_2)$ lepiej byłoby wpisać „imidazol”

- strona 81 Schemat 48 w tekście jest zapisane iż dla związku 17 i 20 zaobserwowane są trzy konformacje a na schemacie 48 przedstawione są dwie

- strona 121 związek 10 jest pochodną sulfanylową a nie sulfonylową co w publikacji z 2016 roku zostało poprawnie zapisane

Różne uwagi nie umniejszą mojej bardzo dobrej opinii o przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pani magister Arlety Sierakowskiej zatytułowanej „Synteza, analiza spektroskopowa oraz ocena aktywności biologicznej nowych pochodnych kofeiny” którą oceniam wysoko. Na moją ocenę wpływa fakt, iż doktorantka dokonała syntezy kilkudziesięciu nowych związków - pochodnych kofeiny. Nie sposób nie docenić także żmudnego charakteru przeprowadzonych badań multidyscyplinarnych prowadzących do uzyskania szeregu dobrych i bardzo dobrych korelacji wyników w aspekcie wielokierunkowych badań w zakresie aktywności biologicznej, poszukiwania nowych potencjalnych leków.

Podsumowując, recenzowana rozprawa doktorska prezentuje interesujący materiał badawczy i spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, Dz. U. Nr 65 z 2003 roku i z późniejszymi zmianami) jak i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim, wnoszę o dopuszczenie jej autora Panią magister Arletę Sierakowską do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

