

Poznań, 28.12.2023 r.

dr hab. Krzysztof Brzeziński, prof. IBCH PAN
Zakład Biologii Strukturalnej Organizmów Prokariotycznych
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
e-mail: kbrzezinski@ibch.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Andrii Pyriha

z tytułowanej

”Proton tautomerism and stereoisomerism in 1,3-thiazolidinone derivatives”

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska Pana mgr Andrii Pyriha zatytułowana *”Proton tautomerism and stereoisomerism in 1,3-thiazolidinone derivatives”*, która została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Jaskólskiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Zainteresowania naukowe Doktoranta skupiają się na syntezie oraz analizie strukturalnej związków organicznych o potencjalnych właściwościach farmakologicznych, warunkujących ich zastosowanie w nowych terapiach przeciwnowotworowych. Zaprezentowane badania dotyczą głównie syntezy, badań krystalograficznych i spektroskopowych serii amidyn, pochodnych C5-ylidenowych 4-fenylamino-1,3-tiazolo-2(5*H*)-onu. W ramach badań, Doktorant wybrał dwa przeciwstawne pod kątem wywoływanego efektu mezomerycznego podstawniki C5-ylidenowe: (i) elektrono-donorowe ugrupowanie dimetyloaminometylidenowe oraz (ii) elektrono-akceptorowe ugrupowanie metoksykarbonylometylidenowe. Dodatkowo, Doktorant zsyntezował i przeprowadził analizę strukturalną dla C5-ylidenowych pochodnych zawierających zróżnicowane chemicznie i sterycznie podstawniki na pierścieniu fenylowym (grupa -OH, -OCH₃ i -CF₃). Głównym celem tych badań było wyjaśnienie wpływu podstawników o określonych właściwościach elektronowych i sterycznych na strukturę badanych pochodnych, zwłaszcza w aspekcie wytłumaczenia wysokiej trwałości aminowej formy tautomerycznej otrzymanych amidyn. Doktorant osiągnął zamierzone cele w oparciu o badania oparte na metodach krystalografii, analiz spektroskopowych opartych na metodach NMR i FT-IR oraz obliczeniach teoretycznych. Ponadto, Doktorant zamieścił wyniki badań biologicznych opisujących wpływ wybranych związków na określone linie komórkowe ludzkich nowotworów.

Dorobek naukowy Doktoranta jest znaczący. Jest on współautorem siedmiu publikacji z listy JCR, z czego pięć prac włączono do jego rozprawy doktorskiej. W sześciu z nich jest pierwszym autorem. Ponadto, czynnie uczestniczył w dwunastu konferencjach krajowych i zagranicznych, z czego cztery prezentacje plakatowe były związane z tematyką przedstawioną w rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim, w formie spójnego zbioru publikacji zawierającego pięć prac eksperymentalnych. Prace te opublikowano w czasopismach typowych dla badań z zakresu analizy strukturalnej i spektroskopowej małowcząsteczkowych związków organicznych: *Journal of Molecular Structure* (3 publikacje), *Acta Crystallographica section B* (1 publikacja) oraz *Acta Crystallographica section C* (1 publikacja). We wszystkich powyższych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. W swojej rozprawie doktorskiej, mgr Pyrih przedstawił opis swoich badań z podziałem na streszczenie, listę osiągnięć publikacyjnych i konferencyjnych (wyodrębniając część wchodzącą w zakres rozprawy doktorskiej oraz pozostałe osiągnięcia), wprowadzenie, cele badań, część metodyczną, główne wyniki i dyskusję każdej z publikacji, podsumowanie przedstawionych wyników, listę odnośników oraz suplement zawierający wydruk prac D0-D5 oraz podpisane oświadczenia Doktoranta i wszystkich współautorów publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej. Opis oparto na licznych pozycjach literaturowych, opublikowanych w uznanych periodykach związanych między innymi z syntezą oraz analizą strukturalną i spektroskopową związków o zbliżonej strukturze chemicznej i właściwościach biologicznych.

Na podstawie oświadczenia złożonego przez Doktoranta oraz dostarczonych oświadczeń pozostałych współautorów pięciu publikacji zawartych w tej rozprawie wnioskuję, że wniósł on znaczący wkład w powstanie tychże pięciu publikacji. Według dostarczonych oświadczeń, zakres badań Doktoranta dotyczył syntezy i analizy krystalograficznej zaprezentowanej serii amidyn oraz czynnie uczestniczył w dyskusji wyników oraz przygotowaniu każdego manuskryptu.

Pięć prac włączonych do spójnego zbioru publikacji, składających się na rozprawę doktorską mgr Andrii Pyriha, przedstawia struktury krystaliczne oraz analizę spektroskopową pochodnych C5-ylidenowych 4-fenyloamino-1,3-tiazolo-2(5*H*)-onu. Badania zostały wzbogacone o obliczenia teoretyczne oraz, w jednym przypadku, o badania biologiczne. Publikacje zostały zaprezentowane w standardowy dla tego typu prac sposób. W ramach badań, Doktorant otrzymał i scharakteryzował strukturalnie dwadzieścia pochodnych amidynowych o potencjalnej aktywności farmakologicznej. W przypadku zaprezentowanej analizy strukturalnej, niewątpliwą zaletą tych badań jest zastosowanie szeregu komplementarnych metod, włączając metody krystalografii oraz analizę spektroskopową FT-IR i NMR, wspomaganych obliczeniami teoretycznymi. Najważniejszym osiągnięciem płynącym z badań mgr Pyriha, które niewątpliwie stanowi element nowości naukowej, jest wykazanie braku wpływu podstawników w pozycji C5 i N7 4-fenyloamino-1,3-tiazolo-2(5*H*)-onu na równowagę tautomeryczną

formy aminowej i iminowej. Zarówno przy braku podstawników obu pozycjach, czy też w obecności ugrupowania elektrono-donorowego lub elektrono-akceptorowego w pozycji C5 z jednoczesną obecnością pierścienia fenyloвого (niepodstawionego lub z podstawnikami odpowiedzialnymi za dodatni lub ujemny efekt mezomerycznego) w pozycji N7, w eksperymentach obserwowano jedynie formę N7-aminową pochodnych amidynowych. Kolejną ciekawą obserwacją jest zachowanie konformacji synperiplanarnej pierścienia fenyloвого, niezależnie od wielkości podstawnika. Podsumowując ten fragment recenzji, całość pracy oceniam wysoko. Zastosowanie przez Doktoranta szeregu komplementarnych metod badawczych dowodzi solidnego merytorycznego przygotowania mgr Andrii Pyriha do dalszej, niezależnej pracy naukowej. Jednakże poniżej chciałbym przedstawić moje uwagi lub podkreślić pewne zagadnienia, które mogłyby być zaprezentowane w bardziej czytelny sposób:

- W ramach rozprawy doktorskiej przedstawiono zbiór zawierający pięć spójnych publikacji D1-D5, dlatego wprowadzenie publikacji D0 wprowadza pewien zamęt. Po pierwsze, nie widnieje ona liście prac przedstawionych na stronie 6. Ponadto, nie dotyczy ona podstawionych pochodnych 4-fenyloamino-1,3-tiazolo-2(5*H*)-onu. Dlatego uważam, że powinna być ona omówiona we wprowadzeniu, a nie w sekcji wyników i dyskusji. Ponadto, niejasna jest dla mnie przyczyna, dla której Doktorant omawiania niezwiązane z tematyką rozprawy doktorskiej wyniki strukturalne dotyczących upakowania cząsteczek izorodaniny w sieci krystalicznej. Kolejność publikacji przedstawionych na stronie 6 (według dat) jest inna niż ta przedstawiona jako suplement D1-D5, co dodatkowo zmniejsza czytelność rozprawy doktorskiej,
- Przy omawianiu pracy D0 (strona 24) Doktorant wskazuje, że uzyskane przez niego wyniki są w sprzeczności z rezultatami przedstawionymi w pracy Valls *et al.*, 1985, gdzie w roztworze obserwowano iminową formę tautomeryczną 4-fenyloamino-1,3-tiazolo-2-onu. Jednakże na stronach 812-813 pracy D0 autorzy wskazują badania IR były prowadzone w fazie stałej,
- Pisząc o aminowej i iminowej formie tautomerycznej badanych pochodnych amidynowych, ułatwieniem byłoby podawanie odpowiedniego lokantu np. forma N7-aminowa. Pozwoliłoby to uniknąć nieporozumień, jak na stronie 31, pierwsze dwie linie tekstu pod opisem ryciny 4.3.3, gdzie Doktorant pisze o formie aminowej (zapewne N7), a omawia wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe utworzone z wykorzystaniem akceptorowego iminowego atomu N3,
- Stosowanie schematów przedstawiających wzory strukturalne analizowanych amidyn byłyby przydatne przy omawianiu każdej publikacji,
- Pewnym niedosytem jest brak tabeli podsumowującej badania krystalograficzne oraz analizę geometryczną badanych pochodnych amidynowych, zwłaszcza przedstawiającą długości wiązań N3-C4 i C4-N7 (analogiczne do wyników zaprezentowanych w Tabeli S3),

- W oparciu o badania krystalograficzne Doktorant lokalizował atomy wodoru w oparciu o różnicowe mapy Fouriera. Przykładowy rysunek byłby dobrym uzupełnieniem omawianych wyników. Dodatkowo, uważam, że w dyskusji zabrakło wyników z badań spektroskopowych, np. omówienia widm, w aspekcie braku iminowych form tautomerycznych,
- Równowaga tautomeryczna jest zależna od środowiska (tzw. efekt rozpuszczalnika), jednakże pomiary spektroskopowe, zwłaszcza NMR prowadzono w roztworze DMSO. Czy próbowano przeprowadzić pomiary spektroskopowe w innych rozpuszczalnikach?
- Mam kilka uwag dotyczących testów biologicznych. Po pierwsze, uważam, że nie są to testy przeciwnowotworowe. W badaniach nie celowano w określone onkogeny czy mechanizmy nowotworzenia. Testowano jedynie wpływ szeregu związków na liczne linie komórek nowotworowych, bez porównania z ich wpływem na linie komórkowe nienowotworowe. Także, określono jedynie ich cytotoksyczność. Dodatkowo, w Tabeli 4.6.1 podano zakres zmiany przyrostu komórek, co świadczy o tym, że pomiary wykonywano kilkukrotnie. Na tej podstawie wyznaczono parametr GP świadczący o potencjale farmakologicznym poszczególnych związków. Jednak uważam, że bez podania wartości odchyłeń standardowych, parametr GP jest niemiarodajny,
- Badania biologiczne wykazują niewielką cytotoksyczność badanych związków. Jako przyczynę, wskazuje się ich słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych (publikacja D5). Czy Doktorant rozważał zwiększenie rozpuszczalności badanych związków np. poprzez utworzenie soli amidynionowych lub innych pochodnych?

Reasumując, rozprawa doktorska mgr Andrii Pyriha przedstawia interesujące wyniki dotyczące analizy strukturalnej pochodnych C5-ylidenowych 4-fenyloamino-1,3-tiazol-2(5*H*)-onu. Biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy pracy, jej interdyscyplinarny oraz zakres świadczący o samodzielności Doktoranta w prowadzeniu badań naukowych, stwierdzam, że rozprawa spełnia kryteria określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM o dopuszczenie mgr Andrii Pyriha do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.