



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

dr hab. inż. Elżbieta Wojaczyńska, prof. uczelni
Wydział Chemiczny Politechniki Wroclawskiej
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50 370 Wrocław
tel. 71 320 2410
e-mail: elzbieta.wojaczynska@pwr.edu.pl

Wrocław, 28 maja 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Czerwonki,
zatytułowanej „Synteza i badania aktywności biologicznej pochodnych związków naturalnych –
salinomycyny i kolchicyny”,
wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

Chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego od lat dostarcza ludziom użytecznych produktów, dość wspomnieć sztuczny jedwab, bawełnę strzelniczą, gumę, margarynę czy bioestry. Wprowadzając do cząsteczek substancji bioaktywnych określone zmiany strukturalne dąży się do wzmocnienia korzystnych właściwości i osłabienia niepożądanych (np. toksyczności, niestabilności) czy rozszerzenia zakresu działania (niekiedy prowadzi to do nowych połączeń o całkowicie odmiennych, nieoczekiwanych cechach i możliwych zastosowaniach). Generalnie podejście takie jest uzasadnione, jeśli dysponujemy związkiem, który jest izolowany ze źródeł naturalnych w wystarczających ilościach i o odpowiedniej czystości, a którego synteza byłaby zadaniem trudnym i kosztownym (zwłaszcza w przypadku złożonych chiralnych układów o określonej stereochemii). Nie oznacza to braku wyzwań dla chemika-syntetyka: nierzadko wymagane jest opracowanie przekształceń, które (np. ze względu na obecność kilku grup funkcyjnych) będą chemo-, regio- i stereoselektywne. Modyfikacja struktury dwóch związków o obiecującej aktywności antyproliferacyjnej, salinomycyny oraz kolchicyny, stanowiła przedmiot badań opisanych w pracy doktorskiej mgr Dominiki Czerwonki. Rozprawa powstała na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką prof. dr. hab. Adama Huczyńskiego, a promotorem pomocniczym był dr Michał Antoszczak.

Praca ma charakter kompilacji – składa się na nią sześć publikacji oryginalnych, których pani Czerwonka jest współautorką, we wszystkich wymienioną na pierwszym miejscu. Artykuły zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach (IF w granicach 2,8-4,4, 70-140 punktów ministerialnych; jedno nowe czasopismo jeszcze nie otrzymało punktacji). Z oświadczeń Doktorantki, promotorów i pozostałych współautorów prac wynika jednoznacznie, że wykonała ona zdecydowaną większość badań eksperymentalnych w zakresie syntezy i charakterystyki opisywanych związków, a także część badań biologicznych. Można zatem stwierdzić, że przedstawiony cykl spójnych

tematycznie publikacji może stanowić podstawę jej pracy doktorskiej. Interesującym zabiegiem jest określenie procentowego wkładu poszczególnych autorów, co może mieć istotne znaczenie dla przyszłych procedur awansowych czy nagród; dziesięcioprocentowy udział promotora wydaje mi się jednak niedoszacowany.

Zestaw sześciu artykułów poprzedzony jest przewodnikiem zawierającym zwięzłe wprowadzenie, określenie celu badań oraz skondensowany opis najważniejszych uzyskanych wyników. Wstęp poświęciła Doktorantka problematyce ograniczonej skuteczności stosowanych obecnie terapii przeciwnowotworowych oraz wykorzystaniu związków pochodzenia naturalnego w projektowaniu nowych leków. Na tym tle zaprezentowane zostały dwa związki wiodące wykorzystywane podczas opisanych w doktoracie badań, salinomycyna i kolchicyna. Autorka wymienia ich źródła pochodzenia oraz podstawowe zastosowania terapeutyczne. W opisie salinomycyny zabrakło mi wskazania jej ograniczeń, które skłaniają do modyfikacji podstawowej struktury. Warto było też pokrótce przedstawić, jakich przekształceń dokonano już podczas dotychczasowych badań, choćby tylko prowadzonych w grupie prof. Huczyńskiego, który zajmuje się tym związkiem od ponad 10 lat. Podobne zastrzeżenie dotyczy także badań nad kolchicyną.

Cel pracy jest jasno przedstawiony, chodziło o wprowadzenie takich zmian strukturalnych, które dawały szansę na zwiększenie selektywności salinomycyny i kolchicyny. Wymagało to zaprojektowania odpowiednich syntez, ich wykonania, wyizolowania, oczyszczenia i identyfikacji produktów (niekoniecznie takich, jak planowane), a następnie – już we współpracy ze wyspecjalizowanymi grupami badawczymi – zbadania aktywności antyproliferacyjnej. Końcowym efektem miało być określenie wpływu określonych modyfikacji na działanie pochodnych związków bazowych na komórki nowotworowe, taka korelacja mogłaby następnie być wykorzystana w dalszych badaniach zmierzających do uzyskania optymalnej struktury.

Prezentację sześciu publikacji poprzedza jeszcze wprowadzenie do stosowanych technik analitycznych oraz do badań aktywności biologicznej (to drugie uważam za zdecydowanie bardziej przydatne). Jako pierwsze opisuje Doktorantka trzy artykuły dotyczące modyfikacji salinomycyny w pozycjach 1 i/lub 20. W pierwszym z nich wykorzystano przekształcenie grupy karboksylowej z C1 w serię amidów trzeciorzędowych, dla części z nich przeprowadzono również selektywne utlenianie grupy hydroksylowej na C20. Mgr Dominika Czerwonka otrzymała łącznie 21 takich pochodnych. Z opisu nie wynika, czym kierowała się dokonując takich właśnie transformacji i dobierając określone aminy do reakcji. W przypadku publikacji II takie uzasadnienie pada, inspiracją była praca grupy Wu dotycząca epimeryzacji salicynomycyny w pozycji 20. Doktorantka otrzymała 26 związków z odwróconą konfiguracją C20 (część również podstawionych na C1): estrów, węglanów i uretanów. Łącząc uzyskane informacje o pozytywnym wpływie epimeryzacji (z własnych badań) oraz wprowadzenia podstawnika aminowego w pozycję 20 (doniesienie z grupy Rodrigueza), postanowiła następnie zsyntezować 18 amin drugo- i trzeciorzędowych przyłączonych do atomu (S)-C20 w czteroetapowej procedurze. Wszystkie pochodne salinomycyny zostały wykorzystane w testach antyproliferacyjnych, przy czym w przypadku artykułu III były one prowadzone z udziałem Doktorantki. Na szczególną uwagę zasługuje uzyskany wynik dla związków z podstawnikiem dietyloaminowym i dipropyloaminowym w położeniu *epi*-20, wykazujących wyjątkowo dużą cytotoksyczność w stosunku do linii komórek nowotworowych, przede wszystkim tych o cechach komórek macierzystych. Uzupełniająca informacja o międzynarodowym zgłoszeniu patentowym potwierdza właściwy kierunek przeprowadzonych modyfikacji.

Opis trzech publikacji poświęconych modyfikacji kolchicyny poprzedziła Autorka wprowadzeniem wskazującym do dodatkowe trudności związane z pracą z tym alkaloidem. Jedną z nich jest tautomeryzacja, której warto może być poświęcić nieco więcej uwagi, bo nie jest to typowa prototropia, a przeniesienie grupy metylowej. Nasuwa się też pytanie, czy skoro przekształceniu sprzyja środowisko kwaśne i podwyższona temperatura, to czy można uniknąć komplikacji nie używając kwasu i obniżając temperaturę podczas stosowanych manipulacji? Drugim z możliwych problemów (oba rzeczywiście wystąpiły podczas pracy nad doktoratem) jest podatność kolchicyny na fotoizomeryzację oraz fotodimeryzację.

Modyfikacje wyjściowego alkaloidu opisane w pracach **IV-VI** obejmowały wszystkie trzy pierścienie i polegały m.in. na wprowadzeniu podstawników estrowych w miejsce metoksyłowych w pierścieniach A (pozycja 1, dla tiokolchicyny) lub C (pozycja 10/9) oraz fragmentów aminowych bądź amidowych w pierścieniu C lub/i B (w tym drugim przypadku również dla tiokolchicyny). Znaczna podatność związków opisanych w publikacji **V** na działanie światła sprawiła, że Doktorantka otrzymała też ich fotoizomery (mechanizm ich powstawania stanowił przedmiot dodatkowych badań), co zwiększyło pulę pochodnych do 52. Wszystkie zostały scharakteryzowane i sprawdzone w testach antyproliferacyjnych, a część pochodnych aminowych opisanych w pracy **VI** okazała się bardziej aktywna i selektywna od kolchicyny. Można się spodziewać, że związki te będą przedmiotem dalszych badań.

Syntezy przeprowadzone przez mgr Dominikę Czerwonkę wskazują na dobre opanowanie procedur eksperymentalnych stosowanych w chemii organicznej, a także najważniejszych technik analitycznych używanych do identyfikacji oraz charakterystyki otrzymanych pochodnych, w szczególności spektroskopii NMR (^1H , ^{13}C), w tym technik dwuwymiarowych, niezbędnych do określenia struktury niektórych produktów. W przypadku badań opisanych w publikacji **III**, w trakcie stażu w Instytucie Curie w Paryżu, Doktorantka uczestniczyła też osobiście w testach aktywności biologicznej.

Zaprezentowany przez Autorkę opis badań własnych jest oczywiście bardzo skrótowym przedstawieniem treści publikacji, pojawiające się ewentualne wątpliwości można rozwiązać, sięgając do prac umieszczonych w dalszej części rozprawy.

Wprowadzenie do rozprawy przygotowane zostało bardzo starannie, z dużą dbałością o stronę graficzną. Bardzo cenne są czytelne, opracowane z zastosowaniem klucza kolorystycznego schematy, w syntetyczny sposób prezentujące przeprowadzone przekształcenia. To duże ułatwienie dla czytelnika (np. recenzenta), bowiem w niektórych przypadkach ujęcie to jest bardziej klarowne niż w publikacjach oryginalnych. Na rysunku 10 można było zaznaczyć stereochemię połączenia pierścieni C i D, choć jednoznacznie wynika ona z tekstu.

Komentarz napisany jest w sposób spójny i logiczny. Autorka posługuje się poprawną polszczyzną, język przewodnika jest właściwy dla opracowań tego typu. Z rzadka pojawiają się niezręczności stylistyczne, np. na str. 37 czytamy, że „struktura tego związku nie uniemożliwia mu wiązania się z kolchicynowym miejscem wiążącym w tubulinie”. Interpunkcja nie budzi większych zastrzeżeń, zabrakło raptem kilku przecinków. Drobne błędy nie utrudniają lektury.

Trudno oczywiście doszukiwać się poważnych uchybień w artykułach opublikowanych w renomowanych, recenzowanych czasopismach naukowych. Zaskoczył mnie jednak fakt, że tylko w jednej publikacji (w *ACS Organic & Inorganic Au*) związki scharakteryzowano wysokorozdzielczą spektrometrią mas, a w pozostałych wykonano jedynie pomiary z niską rozdzielczością. W przypadku pracy **V** w *Journal of Organic Chemistry* charakterystyka związków została uzupełniona o analizę

elementarną. Wskazuje to na wyższe wymagania czasopism ACS dotyczące identyfikacji i określenia czystości związków, bardzo istotnych z punktu widzenia ich wykorzystania w badaniach biologicznych.

W pracy V zabrakło mi natomiast szczegółów dotyczących fotoizomeryzacji otrzymanych pochodnych pod wpływem światła słonecznego. Wiemy, że po 5 dniach z ich roztworów wykrystalizowały produkty przekształcenia, jednak co pozostało w roztworze? Z jaką wydajnością zachodzi ten proces, czy obserwuje się go również dla próbek stałych? Wydajności określone zostały dla przemiany wywołanej przy pomocy lampy rtęciowej; nastąpiła całkowita konwersja substratów, a główne fotoprodukty wyizolowano z wydajnością 31-61%. Co się stało z pozostałą częścią substratów, czy badano mieszaninę poreakcyjną przy pomocy NMR?

Na ile problem fotoizomeryzacji pod wpływem światła słonecznego jest istotny dla innych badanych pochodnych, opisanych w pracach IV i VI?

Wprowadzone modyfikacje nakierowane były przede wszystkim na zmniejszenie toksyczności związków bazowych dla komórek niezmiennych chorobowo, z zachowaniem aktywności wobec komórek nowotworowych. Innym problemem, o którym wspomina Autorka, pisząc o kolchicynie, jest ograniczona biodostępność. Czy nowe pochodne są pod tym względem lepsze? W badaniach biologicznych stosowane były roztwory w DMSO, to ogranicza dość istotnie możliwość ewentualnych zastosowań terapeutycznych. Czy rozważane było otrzymanie pochodnych rozpuszczalnych w wodzie?

Zastanawia mnie także, czy nie warto byłoby pokusić się o wsparcie planowanych przekształceń o elementy obliczeń, zwłaszcza w przypadku kolchicyny, w przypadku której postuluje się określony mechanizm działania (oddziaływanie z tubuliną). Oczywiście wyniki dokowania molekularnego i tak wymagają weryfikacji, ale mogą sugerować określone kierunki działania.

Wymienione w recenzji wątpliwości i dostrzeżone uchybienia nie wpływają na ogólną bardzo pozytywną ocenę rozprawy. Jej Autorka, mimo przeciwności, uzyskała wiele wyników noszących znamiona nowości naukowej. Na uwagę zasługuje ogrom wykonanej pracy: ponad 120 otrzymanych pochodnych (blisko 100 nowych) salinomycyny i kolchicyny oznacza, że należało przeprowadzić kilka razy tyle reakcji, rozdzielić produkty i je scharakteryzować. Oczywiście, jak należało się spodziewać, nie wszystkie modyfikacje wyjściowych układów poprawiły ich właściwości, ale kilka wyizolowanych związków ma wyraźny potencjał, który, mam nadzieję, zostanie w pełni wykorzystany.

Warta podkreślenia jest znacząca aktywność naukowa mgr Dominiki Czerwonki, która jest współautorką 9 publikacji - oprócz 6 wchodzących w skład rozprawy są to artykuły w *European Journal of Medicinal Chemistry* (2 prace, jedna z nich również dotyczy modyfikacji salinomycyny i zastanawia, czemu nie została włączona do rozprawy) oraz *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Wyniki swoich badań zaprezentowała w postaci posterów na 7 konferencjach. Była kierownikiem grantu NCN *Etiuda 8* oraz wykonawcą w pięciu innych projektach. Mimo pandemii odbyła w 2021 roku dwa kilkumiesięczne staże naukowe. To bardzo dobre osiągnięcia na tak wczesnym etapie kariery naukowej.

Podsumowując, praca doktorska spełnia określone stosownymi przepisami wymagania, a także przyjęte standardy akademickie, co pozwala na postawienie wniosku o przyjęcie rozprawy i o dopuszczenie mgr Dominiki Czerwonki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Wojcieszak