



Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

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

Wrocław, 5 listopada 2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Ciesielskiej, zatytułowanej „Synteza, badania strukturalne i aktywność przeciwnowotworowa nowych fluorowanych aminofosfonianów”, wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Aminofosfoniany są znanymi związkami wykazującymi wszechstronną aktywność biologiczną, która w znacznej części wynika z podobieństwa do pochodnych naturalnych aminokwasów. Możliwość utworzenia dodatkowego centrum stereogenicznego na atomie fosforu otwiera dodatkowe możliwości wpływania na aktywność biologiczną tych związków. Innym często spotykanym farmakoforem są ugrupowania zawierające fluor, np. trifluorometylowa. Połączenie tych elementów strukturalnych w cząsteczkach fluorowanych aminofosfonianów i określenie potencjału terapeutycznego tych połączeń było przedmiotem badań, prowadzonych w ramach pracy doktorskiej przez mgr Karolinę Ciesielską na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod promotorską opieką dr hab. Donaty Pluskoty-Karwatki, profesora UAM. Promotorem pomocniczym był dr Piotr Wawrzyniak.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma postać jednolitego dokumentu liczącego 303 strony (z czego blisko 100 stron stanowią załączniki – kopie widm NMR). Układ treści jest tradycyjny, po określeniu celu pracy następuje część literaturowa, przedstawienie i dyskusja wyników, podsumowanie, część eksperymentalna oraz spis cytowanego piśmiennictwa.

Swoje zamierzenia badawcze mgr Karolina Ciesielska sprecyzowała na początku rozprawy: zamierzała skoncentrować się na syntezie nowych fluorowanych α -aminofosfonianów z wykorzystaniem reakcji Pudowika, ich charakterystyką – w tym określeniem konfiguracji absolutnej głównego produktu syntezy, a finalnie sprawdzeniem aktywności biologicznej wyselekcjonowanych związków (testy cytotoksyczności oraz inhibicji urokinazy).

Zasadniczą część wstępu literaturowego stanowi charakterystyka aminofosfonianów, związków stanowiących główny przedmiot pracy. Pozostałe, wyraźnie krótsze podrozdziały dotyczą organicznych związków fluoru (myślę, że warto byłoby choć wspomnieć o polimerach zawierających ten pierwiastek) oraz urokinazy i jej inhibitorów. Doktorantka porusza się sprawnie w opisywanej tematyce, tekst czyta się dobrze i stanowi on odpowiednie wprowadzenie do dalszej części rozprawy. Parę stwierdzeń wydało mi się dyskusyjnym – wydaje się, że Autorka użyła skrótów myślowych, np. pisząc na temat BSA (str. 37): „Jest to białko występujące w osoczu w dużych ilościach. Pełni bardzo ważną funkcję w dystrybucji leków i ich

metabolizmie.” – rozumiem, że chodzi o leczenie krów? Na stronie 44 o glifosacie czytamy: „W glebie ulega rozkładowi przez mikroorganizmy do nietoksycznych produktów, jakimi są dwutlenek węgla, amoniak i woda [5][10]”. O toksyczność można by się tutaj spierać, natomiast lista produktów nie wydaje się kompletna (brakuje w nich fosforu). Na stronie 64 Doktorantka pisze, że „fluorowane związki organiczne charakteryzują się wysoką trwałością termiczną i oksydacyjną, niską polarnością, małym napięciem powierzchniowym oraz słabym oddziaływaniem międzycząsteczkowym.” To nadmierne uogólnienie, np. fluorometan ma moment dipolowy równy 1,65 debaja, a kwas trifluorooctowy tworzy silne wiązania wodorowe. Gdy mowa o lipofilowości związków fluoroorganicznych (str. 67), że „Nie może być ona również zbyt wysoka, gdyż w konsekwencji prowadzi to do zmniejszenia rozpuszczalności związku.” – warto zaznaczyć, że chodzi o rozpuszczalność w wodzie.

Opis uzyskanych wyników podzielony jest na trzy części. Pierwsza z nich poświęcona jest syntezie imin, stanowiących substraty do otrzymywania aminofosfonianów. Doktorantka opracowała skuteczną metodę mechanochemiczną, polegającą na ucieraniu bagietką fluorowanych aldehydów aromatycznych z pochodnymi aniliny, w tym dwiema chiralnymi aminami. W zdecydowanej większości wydajności były wysokie, sięgające 99%. W drugim etapie otrzymane chiralne iminy mgr Karolina Ciesielska poddała reakcji Pudowika z trzema fosforinami, co pozwoliło uzyskać dziewiętnaście aminofosfonianów zawierających dwa centra stereogeniczne z już niższą wydajnością (22-88%) i zróżnicowaną diastereoselektywnością ($de = 22-78\%$). Ważnym osiągnięciem było określenie stereochemicznego przebiegu reakcji. W przypadku trzech produktów konfigurację powstającego w przewodzie centrum stereogenicznego można było określić na podstawie wyników analizy rentgenograficznej, natomiast dla związku 2.18 Autorka zastosowała pomiary dwuwymiarowych widm NMR (NOESY). Obserwowaną diastereoselektywność uzasadniła, wykorzystując model Ahna-Eisensteina. Po sprawdzeniu, że otrzymane związki wykazują odpowiednie parametry farmakokinetyczne, zostały one przetestowane pod kątem cytotoksyczności, w części przewyższając 5-fluoro-2'-deoksyurydynę. Część pochodnych (choć niekoniecznie te o najwyższej aktywności antyproliferacyjnej) okazały się skutecznymi inhibitorami urokinazy (gorszymi jednak od amilorydu), a ich możliwe oddziaływanie z enzymem zostały określone metodą dokowania molekularnego.

Podsumowanie zawiera zestawienie najważniejszych uzyskanych wyników zebrane w ośmiu punktach oraz obszernie wnioski. Niewątpliwym osiągnięciem mgr Karoliny Ciesielskiej jest skuteczna synteza serii imin, w tym pochodnych zawierających atomy fluoru oraz związków czystych enancjomerycznie, z wykorzystaniem metody mechanochemicznej, a także sprawdzenie możliwości prowadzenia jej w większej skali. Sukcesem było również (stanowiące główny cel pracy) otrzymanie nowych fluorowanych aminofosfonianów, z których część wykazała interesującą aktywność biologiczną. Doktorantka podeszła do badań w sposób systematyczny i skrupulatny. Warto podkreślić przede wszystkim ogrom pracy włożony w charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych związków, zwłaszcza analizę widm NMR, często dość skomplikowanych (zwłaszcza w przypadku mieszanin diastereomerów). Rozumiem, że Autorka wzięła też aktywny udział w badaniach aktywności biologicznej – to nie jest dla mnie całkiem jasne, między innymi dlatego, że w opisie badań własnych posługuje się formami bezosobowymi: „wykonano”, „zaobserwowano” itp. O wkładzie innych osób w przedstawiane wyniki (pomiary rentgenowskie, obliczenia) można jednak wydedukować z podziękowań umieszczonych na początku rozprawy.

Kolejną część stanowią szczegółowe opisy procedur eksperymentalnych (syntezy, pomiary krystalograficzne, obliczenia, testy aktywności biologicznej) oraz charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych związków: opisy widm ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR, dla aminofosfonianów również ^{31}P NMR, HRMS, wyniki analizy elementarnej. Warto podkreślić, że obecność fluoru w cząsteczce znacząco komplikuje analizę widm (sprzężenia ^{13}C - ^{19}F), z czym jednak Autorka poradziła sobie bez zarzutu.

Spis cytowanego piśmiennictwa liczy 185 pozycji, wśród których jedynie 18 pochodzi sprzed 2000 roku. Świadczy to o tym, że poruszana w rozprawie tematyka jest rozwijana, a Autorka śledzi aktualne nurty

badawcze. Lista sporządzona jest bardzo starannie, dostrzegłam jedynie błąd w nazwisku jednego z autorów publikacji 73 (brzmi ono: Ślesak).

Ostatnią część pracy stanowi zestawienie widm NMR otrzymanych związków (pomocne byłyby rysunki przedstawiające struktury związków). Zastanawiam się, czy w niektórych przypadkach odprężanie od ^1H podczas pomiarów ^{19}F NMR nie ułatwiłyby analizy.

Rozprawa napisana jest generalnie poprawnym językiem naukowym. Nieprecyzyjne lub niepoprawne sformułowania („moc wiązania”, „chiralny atom węgla”) pojawiają się rzadko. Powtarzającym się błędem jest zbędny apostrof używany w odmianie zagranicznych nazwisk, które tego nie wymagają, mamy więc zasady Schiff’a, zasady i kwasy Lewis’a i Brønsted’a, reakcje Pudovik’a, Kabachnik’a-Fields’a, Michaelis’a-Arbuzov’a, Michaelis’a-Becker’a, Abramov’a, przegrupowanie aza-Claisen’a, chorobę Alzheimer’a, skalę Pauling’a, aparat Dean’a-Stark’a i model Ahn’a-Eisenstein’a. We wszystkich tych przypadkach zapis powinien zostać uproszczony poprzez usunięcie apostrofu. Nie jest on potrzebny, jeśli nazwisko kończy się spółgłoską, wystarczy spojrzeć na takie tytuły, jak „Lista Schindlera”, „Dzieci kapitana Granta”, „Młodość Chopina” czy „Cierpienia młodego Wertera”.

Schematy przekształceń, rysunki przedstawiające struktury badanych związków są estetyczne i czytelne. Materiał graficzny uzupełnia kilka struktur rentgenowskich, efektowne przedstawienia dokowania aminofosfonianów oraz widma NMR. Zauważyłam jeden błąd – w określeniu konfiguracji powstającego centrum stereogenicznego na rys. 30 (str. 61).

W trakcie lektury tekstu nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości:

1. Dla 14 imin umieszczonych w tabeli 1, chociaż są to związki znane, Autorka nie podała wydajności literaturowej ich otrzymywania. Z czego to wynika?

2. Dlaczego iminy otrzymane z (*S*)-3,3-dimetylo-2-butyloaminy, wykorzystywane w syntezie aminofosfonianów, nie zostały opisane w rozdziale 1.1? Czy związki te nie były izolowane i charakteryzowane?

3. Na stronie 91 można przeczytać, że diastereoizomery charakteryzowały się niemal identycznymi wartościami współczynnika retencji, co uniemożliwiło ich rozdzielanie. Współczynnik retencji nie jest parametrem absolutnym – zależy od stosowanej fazy stacjonarnej i eluentu, jakie konkretnie układy Autorka przetestowała?

4. Skąd wynika różny czas procesu hydrofosfonylowania – czy reakcja była monitorowana? Czy temperatura była optymalizowana?

5. Czy dane z Tabeli 8 próbowano zweryfikować eksperymentalnie, np. rozpuszczalność w wodzie czy współczynnik podziału oktanol-woda?

6. Tabela 10 pokazuje wyraźne różnice aktywności związku **2.13** stosowanego w postaci pojedynczego diastereomeru i mieszaniny, co jest dyskutowane w tekście. Czy zatem można porównywać cytotoksyczność innych pochodnych, jeśli różnią się one zawartością diastereomerów?

7. Zabrakło mi dyskusji o wpływie badanych związków na komórki fibroblastów płuc (MRC-5). Związki o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym powinny być możliwie nietoksyczne dla komórek niezmiennych chorobowo, jak Autorka ocenia w związku z tym selektywność działania badanych pochodnych?

8. Warto zauważyć, że choć czysty izomer **2.13** wykazywał niższą cytotoksyczność niż mieszanina diastereomerów, to jednak ten pierwszy był skuteczniejszym inhibitorem urokinazy. Biorąc pod uwagę badania cytotoksyczności oraz inhibicji urokinazy, które pochodne wydają się najbardziej obiecujące?

9. Na stronie 119 czytamy o „energii swobodnej Gibbsa (ΔG), która stanowi sumę entalpii wiązania (ΔH) oraz zmiany entropii (ΔS)” Czy aby na pewno? Które wartości są umieszczone w Tabeli 13?

Powyższe uwagi i pytania nie zmieniają mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej, która zawiera cenny materiał eksperymentalny – mam na myśli zarówno część dotyczącą syntezy, jak i badania aktywności biologicznej. Treść rozprawy dowodzi, że mgr Karolina Ciesielska opanowała wiedzę teoretyczną z zakresu chemii organicznej, spektroskopii i chemii medycznej. Wykazała się też umiejętnościami praktycznymi, związanymi z planowaniem i prowadzeniem eksperymentów oraz interpretacją ich wyników.

Mgr Karolina Ciesielska jest współautorką czterech artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2021-2023 w czasopismach Elseviera (*Biorganic Chemistry*, *Forest Ecology and Management*), Springera (*Amino Acids*) i MDPI (*Molecules*); kolejna praca została wysłana do druku. W jej dorobku znajduje się także 9 prezentacji (postery i komunikaty) na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Są to w mojej ocenie dobre osiągnięcia na tym etapie kariery naukowej.

Kończąc swoją recenzję stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Ciesielskiej spełnia wymagania ustawowe oraz zwyczajowe stawiane opracowaniom tego rodzaju. W związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Handwritten signature in blue ink, reading "E. Wojcieszak".