



Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
prof. dr hab. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 9 czerwca 2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Chrabąszcz zatytułowanej

„*Synteza i aktywność biologiczna metaloorganicznych pochodnych kwasu foliowego oraz wybranych inhibitorów polimerazy tubuliny*” przedstawiona Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem profesora uczelni, dr hab. Damiana Płażuka, którego tematyka badawcza koncentruje się wokół projektowania, syntezy i oceny właściwości biologicznych metalocenowych pochodnych wybranych związków organicznych.

Strategia łączenia dwóch lub więcej fragmentów farmakoforowych w celu otrzymania nowych połączeń hybrydowych o potencjalnie wyższej aktywności biologicznej jest jednym z powszechnie stosowanych podejść w chemii medycznej. Prace badawcze mgr Karoliny Chrabąszcz związane były z syntezą nowych połączeń związków o znanej aktywności biologicznej, tj. kwasu foliowego oraz inhibitorów polimerazy tubuliny – etopozydu, tryprostatyny A i metotreksatu, funkcjonalizowanych dodatkowym ugrupowaniem metalocenowym. Wobec wciąż rosnącej potrzeby dostarczenia nowych, skutecznych i selektywnych chemioterapeutyków tematyka recenzowanej rozprawy jest wysoce aktualna.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest obszernym 199-stronnicowym opracowaniem, w którym zachowano układ powszechnie przyjęty dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym. Opis badań własnych poprzedza „Przegląd literatury” stanowiący bardzo dobre wprowadzenie w problematykę badawczą. Doktorantka wprowadza bowiem czytelnika w problematykę leczenia nowotworów, opisując w osobnych podrozdziałach stosowane chemioterapeutyki z grupy modulatorów polimeryzacji tubuliny, inhibitorów topoizomerazy II, strukturalnych analogów związków z grupy pochodnych folianów oraz inhibitorów białek ABC. Ostatni podrozdział tej części dysertacji poświęcono natomiast początkom chemii biometaloorganicznej, ze szczególnym uwzględnieniem opisanych w literaturze ferrocenylowych pochodnych o właściwościach przeciwnowotworowych.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Poszczególne cele badawcze jakie postawiła sobie mgr Chrabąszcz zostały jasno i klarownie zdefiniowane. Badania własne podzielone zostały na 3 części, w których Doktorantka podjęła się ambitnego zadania syntezy i oceny aktywności biologicznej metalocenowych pochodnych wybranych leków etopozydu, tryprostatyny A oraz kwasu foliowego i metotreksatu. W pierwszej części badań zaprojektowano nowe 1,2,3-triazolowe i aminowe analogi etopozydu, w których w miejsce fragmentu węglowodanowego obecnego w cząsteczce etopozydu wprowadzono ugrupowanie ferrocenyłowe albo rutenocenyłowe. Jako substraty do ich syntezy użyto podofilotoksynę oraz odpowiednio sfunkcjonalizowane metaloceny. W celu otrzymania serii pochodnych etopozydu z ugrupowaniem 1,2,3-triazolowym konieczne było przekształcenie podofilotoksyny w 4 β -azydo-4'-O-demetylo-4-deoksypodofilotoksynę, co zrealizowano w sekwencji reakcji demetylowania połączonego z inwersją konfiguracji przy C4, a następnie azydowania. Kluczowym etapem była reakcja Hüsigena azydu z odpowiednimi alkynilo- i alkynoilometalocenami katalizowana jonami miedzi(I). W syntezie serii aminowych analogów etopozydu wykorzystano powyższą azydową pochodną epipodofilotoksyny, którą poddano uwodornieniu do aminy, a następnie przeprowadzono aminowanie redukcyjne z odpowiednimi formylowymi pochodnymi metalocenów. Wszystkie otrzymane w ten sposób pochodne przekazano następnie do badań aktywności antyproliferacyjnej względem wybranych linii komórek nowotworowych (gruczolakoraka płuc A549, gruczolakoraka jelita grubego SW620, raka jelita grubego Colo 205, raka wątrobowokomórkowego HepG2 oraz gruczolakoraka sutka MCF7), które to badania realizowane były w ramach podjętej współpracy z dr Rychlikiem z Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Spośród wszystkich otrzymanych związków wybrano następnie najbardziej aktywne pochodne (jedną pochodną z ugrupowaniem 1,2,3-triazolu oraz cztery pochodne amin, odpowiednio związki **220** oraz **258–260**), dla których wykreślone zostały następnie krzywe przeżywalności w funkcji stężenia związku i wyznaczono wartości IC₅₀ dla linii komórek nowotworowych opornych na etopozyd oraz metotreksat. Badane związki wykazywały aktywność zarówno w stosunku do linii komórek nowotworowych opornych (SW620M) jak i wrażliwych (SW620). Najważniejszym osiągnięciem tej części projektu było wskazanie wśród otrzymanych pochodnych związków o aktywności wyższej niż etopozyd (pochodne **258–260**). Zbadano następnie wpływ związków na zdolność hamowania polimeryzacji tubuliny i aktywności topoizomerazy II. Wykazano, że pochodna aminowa **258** jest inhibitorem zarówno polimeryzacji tubuliny jak i topoizomerazy II. Należy podkreślić, że ta część projektu jest kontynuacją badań nad pochodnymi etopozydu, jakie zespół prowadzi z powodzeniem od kilku lat. Opisana została już m.in. seria 1,2,3-triazolowych koniugatów ferrocenyłowych epipodofilotoksyny (opublikowane w *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 10847–10858). Uzyskane wyniki badań biologicznych dla w/w koniugatów uzasadniają celowość podjętych przez Doktorantkę próby dalszej modyfikacji ich struktury. Mimo że cel badań mgr Chrabąszcz został jednoznacznie określony, to brak nawiązania do wcześniejszych prac zespołu pozostawia pewien niedosyt. Szkoda również, że Doktorantka nie dokonała porównania wyników badań aktywności

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl





biologicznej otrzymanych przez nią 1,2,3-triazolowych koniugatów ferrocenyowych z 4'-O-demetylo-4-deoksyepodofilotoksyną z aktywnością otrzymanych uprzednio w zespole analogicznych pochodnych 4-deoksyepodofilotoksyny (*Dalton Trans.* **2017**, *46*, 10847–10858), mimo że związki te zostały opisane przez Nią w części literaturowej dysertacji.

W dalszej części prac badawczych mgr Chrabąszcz, zainspirowana obiecującą aktywnością biologiczną otrzymanych w macierzystym zespole ferrocenyowych analogów plinabuliny, które okazały się skutecznymi inhibitorami transporterów ABCB1 i ABCG2, zajęła się syntezą i zbadaniem wpływu ugrupowania ferrocenyowego na właściwości biologiczne pochodnych tryprostatyny A, znanego inhibitora polimeryzacji tubuliny. Doktorantka zwróciła bowiem uwagę na podobieństwo strukturalne pomiędzy plinabuliną a tryprostatyną A wynikające z obecności w obu związkach heterocyklicznego fragmentu piperazyno-2,5-dionu. Część prac eksperymentalnych związana z syntezą wspomnianych ferrocenyowych analogów tryprostatyny A zasługuje na szczególne uznanie. Oprócz umiejętności związanych z syntezą połączeń metaloorganicznych Doktorantka miała bowiem okazję zapoznać się i wykorzystać w swoich pracach metody syntezy właściwe dla chemii peptydów. Pierwsze próby syntezy zaprojektowanych połączeń polegały na wykorzystaniu reakcji kondensacji Knoevenagla *N*-acetylo-cyklo-Gly-Pro z odpowiednimi aldehydami z ugrupowaniem ferrocenyowym. Jednak ze względu na niskie wydajności Doktorantka zmuszona była zmienić strategię syntezy, a finalne związki zostały otrzymane efektywnie w sekwencji reakcji, sprzęgania amidu (*S*)-proliny z kwasem propiolowym sfunkcjonalizowanym odpowiednio ugrupowaniem ferrocenyowym, a następnie cyklizacji powstałej pochodnej katalizowanej trimetylofosfiną w obecności kwasu L-gluaminowego. Mgr Chrabąszcz sprawnie poradziła sobie z rozwiązaniem problemu ustalenia stopnia racemizacji jaki ma miejsce podczas cyklizacji, a wyniki badań czystości enancjomerycznej związku **273** udokumentowała załączając chromatogramy uzyskane podczas analizy HPLC z wykorzystaniem chiralnej kolumny odpowiednich pochodnych otrzymanych z (*S*)- i (*R*)-proliny. Wykorzystując różnie podstawione kwasy propiolowe oraz amid (*S*)-proliny otrzymano kolejne cztery związki (oznaczone w pracy jako **275**, **295–297**), dla których również oznaczono nadmiary enancjomeryczne. Szkoda jednak, że Doktorantka opisując badania własne nie podała wartości *e.e.* dla poszczególnych pochodnych. Serię zaprojektowanych związków rozszerzono następnie o pochodne **318–325** otrzymane w wykorzystaniu innych cyklicznych aminokwasów tj. kwasu (*S*)-pipekolinowego, kwasu L-oktahydro-1*H*-indolo-2-karboksyłowego, kwasu (*S*)-indolino-2-karboksyłowego oraz (*S*)-1,2,3,4-tetrahydroizochinolino-3-karboksyłowego. Spośród wszystkich związków otrzymanych w tej części projektu do wstępnych badań aktywności biologicznych wybrano jedynie pochodne proliny, tj. związki (*Z*)-**273**, (*Z*)-**275**, (*Z*)-**295**, (*Z*)-**296**, (*E*)-**296**, (*Z*)-**297** i (*E*)-**297**. Wykonano badania przeżywalności komórek nowotworowych wrażliwych oraz opornych na najczęściej stosowane chemioterapeutyki tj. cisplatynę, doksorubicynę, etopozyd, metotreksat, winkrystynę i mitoksantron. Doktorantka wykazała, że pochodne

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Dorota

fenyłowe, jak również większość pochodnych ferrocenyłowych, są nietoksyczne zarówno w stosunku do linii wrażliwych jak i opornych na wybrane chemioterapeutyki. Natomiast po potraktowaniu komórek mieszaniną chemioterapeutyka i badanego związku zaobserwowano uwrażliwienie komórek nowotworowych na zastosowany chemioterapeutyk. Szczególnie wysoki poziom uwrażliwienia komórek na doksorubicynę, winkrystynę oraz mitoksantron zaobserwowano w przypadku podawania ich ze związkiem (*Z*)-**275**, (*Z*)-**295** i (*Z*)-**265**. Nie zaobserwowano natomiast efektu synergistycznego przy zastosowaniu kombinacji metotreksatu z badanymi związkami. W końcowym etapie tej części projektu przeprowadzono pogłębione badania wpływu zsyntezowanych związków na transport wzorcowych substratów wybranych białek oporności wielolekowej oraz wiązania przeciwciał UIC2 i 5D3. Potwierdzono, że związki (*Z*)-**273**, (*Z*)-**296** i (*Z*)-**275** są substratami dla białek ABCB1 i ABCG2, zaś związek (*Z*)-**295** jest substratem tylko dla białka ABCG2.

W ostatniej części prac badawczych mgr Chrabąszcz zajęła się otrzymaniem ferrocenyłowych (**328–330**, **333**, **334**, **338–340**), jak również niemetaloorganicznych (**326**, **327**, **331**, **332**, **335–337**) pochodnych kwasu foliowego, choć Doktorantka na str. 87 błędnie wszystkie to pochodne nazywa analogami ferrocenyłowymi. Co więcej numeracja zaprojektowanych związków nie odpowiada ich numeracji w dalszej części badań własnych (str. 93) oraz w części eksperymentalnej (str. 177–181, związki **377–391**), co nieco utrudnia analizę tekstu. Bibliotekę zaprojektowanych związków uzupełniają pochodne metotreksatu **397–399**. Podczas realizacji tej części projektu mgr Chrabąszcz wykazała się wyjątkową determinacją. Początkowe niepowodzenia napotkane podczas realizacji wieloetapowych syntez nie zniechęciły Doktorantki, a jedynie motywowały do podejmowania kolejnych prób opracowania efektywnej drogi syntezy finalnych związków. Mnogość przeprowadzonych reakcji świadczy o dobrym przygotowaniu warsztatowym. Stosowane metody dobierane były adekwatnie do potrzeb projektu, choć użycie odczynnika Dess-Martina, wybranego spośród dostępnych utleniaczy z zamiarem utlenienia aldehydu **346** do kwasu **347**, nie wydaje się właściwe (str. 88). Jest to bowiem stosunkowo łagodny reagent stosowany do utleniania odpowiednich alkoholi do aldehydów. Badania biologiczne wykonane dla pochodnych kwasu foliowego i metotreksatu, mimo że nie zwieńczone spektakularnym osiągnięciem dostarczyły cennej informacji w zakresie podejmowanych modyfikacji struktur wiodących. Wykazano, że obecność ugrupowania ferrocenyłowego nie wpływa znacząco na aktywność biologiczną otrzymanych pochodnych.

Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorantka w kolejnych etapach prac badawczych z godnym pochwałą zaangażowaniem podejmowała próby optymalizacji warunków reakcji w celu zwiększenia wydajności, nie poprzestając na wydzielonych początkowo niewielkich ilościach zaprojektowanych związków. Z uwagi na charakter pracy na wysoką ocenę zasługuje część eksperymentalna recenzowanej

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

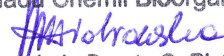
90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



rozprawy, w której Doktorantka przedstawiła szczegółowy opis eksperymentów oraz pełną charakterystykę otrzymanych związków. Wiarygodne opisy pozwalają nie tylko na weryfikację wyników, ale również zapewniają odtwarzalność przeprowadzonych prac. Poprawność przeprowadzonych analiz strukturalnych nie budzi zastrzeżeń, a Doktorantka wykazała się biegłością w interpretacji widm NMR zarówno prostych jak i wielkocząsteczkowych związków organicznych. Doktorantka uzupełniła charakterystykę związków o analizę elementarną, potwierdzając tym samym czystość chemiczną otrzymanych próbek, co świadczy bardzo dobrze o technice pracy Doktorantki, jej doskonałym przygotowaniu warsztatowym i rzetelności naukowej.

Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z wielokierunkowością prowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje również to, że napisana ona została poprawnym językiem. Pochwalić należy również stronę graficzną pracy oraz bardzo staranną korektę edytorską. Umiejętność planowania prac eksperymentalnych, ogromna pracowitość i konsekwencja w rozwiązywaniu problemów badawczych potwierdzają dojrzałość naukową mgr Chrabąszcz.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Chrabąszcz spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz.U. z 2016. Poz. 882). Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bioorganicznej

prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl