

Recenzja pracy doktorskiej zatytułowanej Synteza i zastosowanie chiralnych związków
N-heterocyklicznych, pochodnych 2-azabicykloalkanowych, autorstwa Pani mgr Dominiki Iwan,
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. inż. Elżbiety Wojaczyńskiej.

Pani Dominika Iwan postawiła przed sobą ambitny cel syntezy i scharakteryzowania szeregu właściwości nowych chiralnych związków opartych na szkielecie 2-azabicyklo[2.2.1]heptanowym oraz 2-azabicyklo[3.2.1]oktanowym podstawionymi grupami sulfonamidowymi, amidowymi oraz ugrupowaniem kaliksarenowym. Część z tych badań była przeprowadzona w ramach współpracy z zagranicznymi ośrodkami naukowymi oraz w ramach projektu Harmonia.

Związki chiralne, a szczególnie chiralne związki N-heterocykliczne stanowią ważny obszar badań w dziedzinach chemii organicznej, bioorganicznej oraz farmakologii. Chiralność tych związków odzwierciedla naturalną budowę białek oraz ich elementów składowych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku azabicykloalkanów, gdzie zgodnie z hipotezą sugerowaną przez K. Sharplessa, obecność atomu azotu również zwiększa zgodność i powinowactwo tych związków do układów biologicznych. Wspomnienie tego noblisty w kontekście badań nad chiralnością nie jest zresztą przypadkowe, lecz należy pamiętać, że nie jest to jedyny przypadek gdy uhonorowano w ten sposób badania nad związkami chiralnymi. Szczególnie dla projektowania leków, N-heterocykliczne ugrupowania chiralne stanowią kluczową grupę szkieletów obecną w licznych związkach biologicznie aktywnych. Posiadają one wysoką zdolność do wiązania z różnymi receptorami a ich enancjomery mogą wywoływać zupełnie różne efekty farmakologiczne. Zjawisko to jest zresztą swego rodzaju mieczem obosiecznym w procesie projektowania leków o czym w dramatyczny sposób przekonaliśmy się przy okazji tzw. skandalu talidomidu. Związku właśnie N-heterocyklicznego i chiralnego. Tym ważniejsze stają się badania realizowane w tym zakresie, również w grupie prof. Wojaczyńskiej. Inną obiecującą cechą związków chiralnych jest ich zdolność do działania jako swego rodzaju wzorce molekularne wymuszające powstanie specyficznej konfiguracji produktu w reakcji chemicznej.

Dzięki temu mogą one stanowić katalizatory przydatne w syntezie stereoselektywnej pozwalającej uzyskiwać pożądane enancjomery z wysoką czystością. Najwięcej zalet posiadają organokatalizatory, które nie zawierają atomów metalu w swojej budowie, co pozwala znacznie uprościć procedury syntetyczne a produkty są wolne od zanieczyszczeń metalami, co ma znaczenie zwłaszcza w syntezie środków leczniczych. Podstawową wadą tego typu strategii jest ograniczona stosowalność danego stereokatalizatora, często do kilku lub wręcz jednej reakcji, lub konieczność stosowania długich czasów reakcji oraz użycia znaczących jego ilości. Należy jednak podkreślić, że są to metody stosunkowo nowe, wciąż jeszcze rozwijane, co powoduje, że badania tym zakresie są niezwykle ważne i potrzebne. W ten nurt doskonale wpisują się badania autorki pracy przedstawionej mi do recenzji. O wysokim znaczeniu wyników jej prac świadczą również publikacje czy patenty i zgłoszenia patentowe które powstały w oparciu o wyniki uzyskane przez autorkę, wystąpienia konferencyjne oraz nagrody.

Praca zachowuje układ klasyczny, poprzedzona została streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, zwięzłym dorobkiem autorki oraz spisem stosowanych skrótów. Cel pracy został przedstawiony jasno zachowując odniesienie do istniejącego stanu wiedzy oraz uwagi i przemyślenia autorki co do motywów wyboru danej tematyki. Część literaturowa obejmuje około 50 stron, na których Pani mgr Iwan porusza szereg ważnych aspektów związanych z chiralnością w kontekście chemii organicznej oraz chemii leków. Na uwagę zasługuje prosty lecz klarowny i poprawny styl, praca pozbawiona jest większych potknięć, przyjemna w odbiorze. Podobną objętość rozprawy autorka przeznaczyła na opis badań własnych, który obejmuje obok syntezy i weryfikacji otrzymanych związków, wyniki dodatkowych badań biologicznych. Wyniki te zostały pozyskane w ramach współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii UJ oraz Instytutem Biologii Medycznej PAN, która obejmowała badania aktywności przeciwwirusowej. Przeprowadzono również oznaczenia aktywności przeciwnowotworowej, przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej. Własnym sumptem autorka przeprowadziła też oznaczenia aktywności organokatalitycznej na wybranych reakcjach modelowych.

W swojej pracy laboratoryjnej, autorka przeprowadziła szereg wieloetapowych syntez obejmujących różnorodne przekształcenia i wymagających odpowiedniego opanowania warsztatu. W wielu przypadkach przeprowadzała proste próby optymalizacji procesu, głównie pod kątem czystości enancjomerycznej i wydajności. Ten pierwszy parametr niejednokrotnie okazuje się ważniejszy o czym można się przekonać z przypadku związku 6a zawierającym pierścień furanowy, a którego diastereoizomerów nie udało się „rozdzielić pomimo wielu prób”. Szkoda, że autorka nie podała jakie to próby i dlaczego nie były skuteczne.

Jednak spójność opisów przeprowadzonych eksperymentów oraz swoboda z jaką przeprowadzono dyskusję wyników świadczą o świetnej znajomości tematu i bogatej wiedzy z zakresu syntezy organicznej. W sumie otrzymano kilkadziesiąt związków należących do kilku grup pochodnych. Spora część to związki nowe, nieopisane dotychczas w literaturze naukowej.

Wszystkie zostały scharakteryzowane przy pomocy standardowych metod z uwzględnieniem rentgenografii strukturalnej, pomocnej szczególnie w niektórych przypadkach. W ramach badań aktywności otrzymanych pochodnych przedstawiono wyniki oznaczeń w zakresie aktywności antyproliferacyjnej, przeciwwirusowej i przeciwmikrobiologicznej. Niestety sposób przedstawienia tych wyników jest niezbyt czytelny i poważnie utrudnia ocenę rzeczywistej wartości tych badań. Autorka zdecydowała się przedstawić jedynie wybrane związki. Takie postępowanie można zaakceptować z uwagi na zachowanie zwięzłości rozprawy jednak wymaga ono starannego przemyślenia prezentacji wyników. Przykładowo w tabelach 1 (str 93) i 2 (str 94) przedstawiono wyniki oznaczeń antyproliferacyjnych dla różnych związków i różnych dostępnych handlowo normalnych oraz nowotworowych linii komórkowych. Przy czym w opisach tabel oznaczono je jako LD₅₀ wyrażone w mikromolach, podczas gdy w tekście wartości te podane są (poprawnie) jako IC₅₀. W obu tabelach powtarza się jedynie związek 52c. Brakuje również oznaczeń związków referencyjnych, o których autorka wspomina jedynie w dyskusji wyników. Nie przedstawiono również wyników wobec linii nowotworu jelita (HT-29), raka wątrobowokomórkowego czy glejaka wspomnianych na stronie 90. Zarówno w dyskusji jak i w części eksperymentalnej brakuje ważnych szczegółów jak rodzaj testu czy czas inkubacji. Czytelnik jest zmuszony wyłuskać te informacje z cytowanych publikacji co jednak jest utrudnione z uwagi na różnorodne warunki eksperymentów wykonywanych w różnych zespołach.

Aktywność przeciwwirusową oznaczono wobec komórek zainfekowanych wirusem opryszczki HSV-1. Jako potencjalny cel molekularny wybrano proteazę VP24, nie podano jednak podstaw dla tej hipotezy. Aktywność została wyznaczona jako ilość kopii DNA wirusa metodą PCR po uprzedniej weryfikacji wpływu badanych związków na przeżywalność komórek zainfekowanych HSV-1. Wysoka aktywność związku 41b (z nieznanymi przyczynami autorka na każdym rysunku zmienia kod dla tego związku) pozwoliła na wytypowanie go jako potencjalnej struktury wiodącej i przeprowadzenie badań kontrolnych *in vivo*. Pozwoliło to również rozszerzyć zakres badań o dodatkowe wirusy min grypy (HPIV-3) czy adenowirusa. Wprawdzie wyniki badań nie spełniły oczekiwań wobec badanych związków jednak stanowią ważną informację oraz istotny wkład w poznanie aktywności związków azabicyklooktanowych. Niestety sposób przedstawienia wyników przeciwwirusowych również mógłby być lepszy. Przede wszystkim, brak jest opisów procedur eksperymentalnych dla wykonanych badań.

Nawet jeśli prace zostały wykonane w innych ośrodkach te informacje są kluczowe dla pełnego zrozumienia przedstawianych wyników. Dyskusja wyników wyraźnie wskazuje że autorka nie czuje się pewnie na gruncie chemii medycznej. Przykładowo na stronie 79 można przeczytać „Biorąc pod uwagę udowodnioną aktywność alifatycznych poliamin m.in. w różnych procesach fizjologicznych np. ekspresji genów...” do którego autorka przedstawia trzy źródła literaturowe. Żadne z nich jednak nie dotyczy wyników związanych z ekspresją genów. Publikacja 261 obejmuje wyłącznie proste wyniki aktywności antyproliferacyjnej, a w pracy nr 262 można znaleźć wyniki badania poziomu białek, jednak bez odniesienia do aktywności samych genów. Na stronie 101 natomiast można znaleźć definicję indeksu selektywności jako: porównania cytotoksyczności komórek zdrowych do „komórek wirusa”.

Szczególnie interesujące wyniki przyniosły pomiary aktywności organokatalitycznej otrzymanych pochodnych. Dla każdej z grup 2-azabicykloalkanowych, N-heterocyklicznych sulfonamidów oraz tiomoczników 2-azabicyklooktanowych udało się wyłonić związki efektywne w katalizowaniu modelowych reakcji. Najlepsze okazały się pochodne dansylowe zapewniające wysoką wydajność reakcji oraz czystość enancjomeryczną w reakcjach asymetrycznego α -aminowania. Dla pochodnej pirolidynowej 58 wyniki przedstawione w tabeli 4 na stronie 112 są szczególnie wartościowe, wykazując że związek ten posiada duży potencjał wdrożeniowy.

Część eksperymentalna zawiera opisy przeprowadzonych syntez, a ich szczegółowość nie pozostawia wątpliwości co do ich powtarzalności. Struktura każdego związku została zidentyfikowana przy pomocy standardowych metod spektroskopowych, tam gdzie związki były już znane porównano otrzymane widma z danymi literaturowymi. Autorka nie podaje temperatur topnienia co jest (niestety) standardem w dzisiejszej literaturze naukowej. Zamieszcza natomiast widma zmierzone dla izotopów protonu ^1H oraz węgla ^{13}C oraz także chromatogramy dla otrzymanych mieszanin.

Całość domyka spis cytowanej literatury obejmujący 342 pozycje w zdecydowanej większości publikacje w czasopiśmie naukowych z ostatnich 20 lat. Dobór źródeł jest poprawny z wyjątkiem wspomnianych pozycji 260-262 oraz pozycji 301 cytowanej na stronie 91 jako informacje podane za WHO.

Reasumując stwierdzam że przedstawiona mi do recenzji praca stanowi nowe opracowanie w zakresie chemii organicznej oraz wnosi znaczący wkład w badania nad syntezą asymetryczną, zwłaszcza w kontekście organokatalizy. Autorka wykazała się wysoką znajomością zagadnień z zakresu syntezy organicznej, poprawnością w formułowaniu wniosków oraz swobodą w analizowaniu wyników badań. Uwagi prezentowane w niniejszej recenzji dotyczą wąskiego aspektu przedstawionych wyników, które były realizowane w ramach współpracy i nie pomniejszają mojej pozytywnej opinii o pracy.

Pani mgr Dominika Iwan przedstawiła wartościową dysertację opisującą rozwiązanie ważnego problemu naukowego. O wysokim poziomie badań świadczą również publikacje naukowe, które powstały w trakcie badań. Warto wspomnieć, że Pani Iwan jest współautorką 9 prac opublikowanych w przyzwoitych czasopismach naukowych, dwóch patentów oraz dwóch zgłoszeń patentowych. Na tym etapie jest to bogaty dorobek dobrze świadczący o naukowej samodzielności doktorantki.

Przedstawiona mi do recenzji praca **spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Robert Klusio