



UNIWERSYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

Prof. dr hab. Adam Huczynski
Zakład Chemii Medycznej, Wydział Chemii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
e-mail: adam.huczynski@amu.edu.pl
<https://adhucz.home.amu.edu.pl/>

Poznań, 16-09-2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Iwan
„Synteza i zastosowanie chiralnych związków N-heterocyklicznych,
pochodnych 2-azabicykloalkanowych”**

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej pod opieką promotorki - prof. dr hab. inż. Elżbiety Wojaczyńskiej.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa doktorska stanowi klasyczną rozprawę, napisaną na 228 stronach, z podziałem na wstęp teoretyczny (50 stron), badania własne (56 stron), spis cytowanej literatury (342 pozycje literaturowe, niestety podane bez tytułów tych publikacji), część eksperymentalną i zbiór danych spektroskopowych.

Wyniki badań opisanych w dysertacji stanowiły materiał, który posłużył do przygotowania aż 6 publikacji naukowych opublikowanych w *Biomedicine & Pharmacotherapy* – 2, *Antiviral Research* – 1, *Molecules* – 2, *Materials* – 1 oraz dwóch prac przeglądowych opublikowanych w *Molecules*. W trzech spośród wymienionych prac pani mgr inż. Dominika Iwan pełni rolę pierwszego autora.

Niezwykle doceniam również, iż Doktorantka współuczestniczyła w 3 polskich i 1 międzynarodowym zgłoszeniu patentowym.

W części teoretycznej swojej dysertacji Doktorantka sprawnie opisuje stan najnowszej wiedzy związanej z tematem rozprawy, tj. znaczenie chiralności w chemii organicznej, znaczenie i aktywność związków N-heterocyklicznych, cykloaddycję aza-Dielsa-Aldera, wybrane modyfikacje 2-azabicyklo[2.2.1]heptanu oraz przykładowe przekształcenia asymetryczne.

Tematyka doktoratu jest kontynuacją rozległych badań prowadzonych w grupie naukowej Promotorki doktoratu i związana jest z badaniami nad stereoselektywną syntezą nowych pochodnych 2-azabicykloalkanowych. Wśród licznie otrzymanych pochodnych były m.in. amidy, sulfonamidy i tiomoczniki. Doktorantka poprawnie scharakteryzowała spektroskopowo nowe i literaturowe związki, a ponadto we współpracy z krystalografami zbadała strukturę w ciele stałym dla aż 11 związków.

Jednak to nie synteza była głównym celem badań prowadzonych przez Doktorantkę, bo gdyby tak było, to dysponowała by Ona tylko garścią nowych związków i danymi fizykochemicznym dla nich zebranymi. Synteza chemiczna była tu narzędziem do otrzymania pożądaných związków chemicznych. Nadrzędnym, w moim odczuciu, celem badań było znalezienie zastosowań, nowych właściwości i aktywności dla tych nowych związków chemicznych. Tu niewątpliwie z pomocą przyszła bogata i interdyscyplinarna współpraca zespołu, w którym przyszło Doktorantce pracować. Dzięki nawiązanej współpracy udało się m.in. przeprowadzić badania aktywności cytotoksycznej wobec wybranych linii komórek nowotworowych, takich jak: komórki ludzkiego raka wątrobowokomórkowego (HCC), rdzeniaka (MB), glejaka wielopostaciowego, białaczki mielomonocytovej (MV4-11), nowotworu płuc (A549) oraz gruczolakoraka okrężnicy (LoVo). Natomiast cytotoksyczność względem normalnych komórek skontrolowano, używając ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) lub prawidłowych mysich fibroblastów (BALB/3T3).

W związku z tym, że ani chemicy, ani biologowie nie wiedzieli, co jest celem komórkowym (lub celami) dla otrzymanych związków, badania miały charakter „rozpoznania bojem”, czyli badań polegających na zbieraniu informacji z równoczesnym prowadzeniem dalszych działań.

I tak w badaniach prowadzonych wcześniej we współpracy z prof. Nataliya Rohr-Udilova z *Uniwersytetu Medycznego w Wiedniu* wykazano interesującą aktywność dla pochodnych 51 i 52c, otrzymanych podczas realizacji doktoratu przez dr inż. Karolinę Kamińską, z zespołu prof. Elżbiety Wojaczyńskiej. To odkrycie pozwoliło wybrać te związki jako struktury wiodące do dalszych optymalizacji chemicznych.

Otrzymane przez Doktorantkę analogi tych związków nie były jednak lepsze, a pisząc otwarcie, wykazywały mniejszą lub znacznie mniejszą aktywność wobec komórek nowotworowych od wyjściowych struktur wiodących. Takie wyniki w chemii medycznej są normalnością, zwłaszcza przy stosowaniu metody „rozpoznania bojem”.

Aktywność otrzymanych w trakcie realizacji doktoratu pochodnych tiomocznikowych i sulfonamidowych przetestowano również wobec bakterii, grzybów i pasożytniczych nicieni we współpracy z doskonałą grupą prof. Ludgera Wessjohanna z *Instytutu Biochemii Roślin im. Leibniza w Halle*. Spośród tych dwóch grup pochodnych aktywne wobec bakterii były tylko tiomoczniki, choć nie znaleziono związku o uniwersalnej aktywności. Testowane pochodne nie wykazały natomiast aktywności wobec nicieni (*C. elegans*). W związku z tym, że autorzy badań nie znali potencjalnego mechanizmu działania swoich związków wobec tak różnych mikroorganizmów, to fakt uzyskania pozytywnego wyniku chociaż w jednej kategorii drobnoustrojów uważam za wielki sukces.

Brakuje mi jednak w dysertacji krytycznego spojrzenia na możliwe biochemiczne i biologiczne kłopoty związane z wyborem tiomoczników jako grupy związków potencjalnie bioaktywnych. Grupa tiomocznikowa zawsze powinna budzić w chemikach medycznych wzmożoną ostrożność (ALERT), gdyż z punktu widzenia dalszych jej losów w organizmach wyższych nie jest ona pożądana ze względu na szkodliwe działanie na mitochondria i hepatocyty (*Chem. Res. Toxicol.* 2011, 24, 9, 1345–1410; *Adv. Pharm. Bull.* 2015, 5(1), 1-11; Miller, A.E., Bischoff, J.J. Chemistry of Metabolites of Thioureas. In: Kocsis, J.J., Jollow, D.J., Witmer, C.M., Nelson, J.O., Snyder, R. (eds) *Biological Reactive Intermediates III. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1986, vol 197. Springer, https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5134-4_89). **Prosiłbym o ustosunkowanie się do tego spostrzeżenia podczas obrony doktoratu.**

Podziwianym przeze mnie dokonaniem tego doktoratu jest podjęcie się testowania kolejnej aktywności otrzymanych związków. Otóż wybrane sulfonamidy 2-azabicykloalkanowe testowano w kierunku inhibicji aktywności proteazy VP24 wirusa opryszczki typu I (*herpes simplex virus 1*, HSV-1). Wybór takiego celu Doktorantka uzasadniła na str. 95 słowami: „Obecnie brak doniesień literaturowych dotyczących skutecznych inhibitorów proteazy VP24 HSV-1. Z tego powodu postanowiliśmy przetestować serię chiralnych sulfonamidów, zawierających szkielet 2-azabicykloalkanowy, w roli potencjalnych inhibitorów, kandydatów na nowe chemioterapeutyki. Motywy strukturalne w proponowanych przez nas związkach znaleźć można również w lekach o działaniu przeciwwirusowym, np. beclabuwirze (stosowany w terapii wirusowego zapalenia wątroby typu C, HCV) czy marawiroku (stosowany w terapii ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu I, HIV-1).” **Ponieważ wspomnianych leków w doktoracie nie pokazano (czego nie**

rozumiem), kieruję jako recenzent prośbę o ich pokazanie podczas obrony doktoratu (wraz z zaznaczeniem wspomnianych motywów strukturalnych).

Wstępne testy przesiewowe 18 sulfonamidowych pochodnych 2-azabicykloalkanów pozwoliły wybrać pochodną 41b, cechującą się niską cytotoksycznością przy dobrej aktywności przeciwwirusowej, jako związek o największym potencjale do badań z udziałem myszy BALB/c zakażonych wirusem HSV-1. Badania *in vivo* pokazały jednoznacznie, że podanie zakażonym myszom związku 41b zwiększyło ich przeżywalność, co jest tym lepszym wynikiem wobec faktu, iż wszystkie zakażone wirusem i nieleczone myszy z grupy kontrolnej umierały na skutek infekcji. Zdaję sobie doskonale sprawę, iż Doktorantka bardzo skrótowo opisuje badania biologiczne swoich współpracowników prof. - Marcina Sieńczyka z PWr oraz dr Renaty Grzywy i prof. Krzysztofa Pyrcia z *Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ*.

Niemniej w doktoracie nie znalazłem dowodu na działanie hamujące aktywność proteazy VP24 wirusa opryszczki. **Proszę podczas obrony doktoratu dodać wzmiankę o przeprowadzonych przez wspomnianych specjalistów badaniach kinetycznych wobec proteazy oraz o dowiedzionym mechanizmie działania, który wynika z hamowania proteazy wirusowej, a co za tym idzie, tworzenia się wirusa i wydostawania się zakaźnych cząstek wirusa. To da jasność słuchaczom podczas obrony.**

Dalsze badania aktywności otrzymanych pochodnych przeciw ludzkiemu adenowirusowi (AdV5), wirusowi paragrypy typu 3 (HPIV-3) oraz wirusowi zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) po raz kolejny udowodniły, iż najlepszym środkiem przeciwwirusowym okazała się dansylowa pochodna 41b, zwłaszcza wobec EMCV.

Tak interesujące wyniki znalazły swoje odbicie nie tylko w publikacjach, które ukazały się w prestiżowych czasopismach naukowych, ale również w polskich i międzynarodowych zgłoszeniach patentowych. To rzecz rzadko spotykana w polskiej rzeczywistości akademickiej. Z punktu widzenia chemika ważne jest to, iż obiekty do badań - związki chemiczne - wyszły z rąk **mgr inż. Dominiki Iwan**.

Uważam za bardzo rozsądne z punktu widzenia Doktorantki (oraz Promotorki) uzupełnienie badań biologicznych o badania nad właściwościami katalitycznymi otrzymanych związków, zwłaszcza iż badania te mają charakter typowo chemiczny. Często w chemii medycznej pozostajemy z szufladą pełną związków, które nie spełniły oczekiwań, co do swojej aktywności biologicznej. Takie podejście pozwala zawsze uniknąć porażki, gdyby związki nie były aktywne biologicznie.

Do największych sukcesów tego nurtu badań, prowadzonych przez Doktorantkę mogę zaliczyć wykazanie, iż pochodna amidowa 33 pozwoliła uzyskać wysoką wydajność (powyżej 95%) w asymetrycznej reakcji aldolowej, choć przy relatywnie niskiej stereoselektywności (do 63% ee). Większym powodzeniem zakończyły się badania elektrofilowego α -aminowania aldehydu 2-fenylopropionowego. Organokataliza z udziałem związków 43b i 58 prowadziła do całkowitej konwersji oraz aż 98% ee. Niezbyt skuteczna w katalizie asymetrycznej reakcji Michaela pomiędzy malonianem dimetylu a trans- β -nitrostyrenem okazała się natomiast seria tiomoczników. Niewiele w indukowaniu enancjoselektywności zmieniło użycie otrzymanej z wielkim nakładem sił i w niezwykle czasochłonnej syntezie tetrawalencyjnej pochodnej kaliksarenowej z układami 2-azabicyklo[3.2.1]oktanowymi.

Pytania i uwagi:

1) Muszę przyznać, że z formalnego punktu widzenia mam pewien problem z rozróżnieniem, co jest dokonaniem Doktorantki osiągniętym w trakcie doktoratu, a co dokonaniem członków zespołu. Sposób wybranej narracji przy pisaniu doktoratu jest dla mnie nie w pełni akceptowalny. Przyczyniają się do tego sformułowania, takie jak: "... zastosowaliśmy chromatografię kolumnową" (str. 117), "... oczyściliśmy przy pomocy filtracji żelowej" (str.118), „.....wykazały ogromny potencjał pochodnej sulfonamidowej 52c, zawierającej szkielet 2-azabicyklo[2.2.1]heptanowy, zsyntetyzowanej i opisanej przez dr inż. Karolinę Kamińską z naszego zespołu" (str.122), "Niestety, związki prowadziły do otrzymania gorszych rezultatów niż pochodna 50a. Opis oraz szczegółowe wyniki badań zostały zawarte w dysertacji mgr. inż. F. Steppelera.", "Charakterystyka związków, metody oczyszczania oraz kopie widm zostały przedstawione w pracy magisterskiej oraz opublikowane w artykule naukowym."²⁸³ Niemniej jednak, związki te są również przedmiotem badań, które realizowałam w ramach pracy doktorskiej, dlatego, w celu zachowania przejrzystości projektu, postanowiłam przedstawić ich struktury również w niniejszej dysertacji."

2) Rysunek 55 – trudno mi przyznać, że rysunek ten udowadnia cokolwiek. Poziom szumu lub matrycy jest równy z intensywnością sygnałów uznanych za sygnał związku. Technika ESI MS powinna dawać lepsze widma masowe takich układów, co pokazano m.in. w pracach *Croatia Chemica Acta* 85(4):469-477 oraz *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; 18: 1493–1503.

3) str. 101. W rozważaniach na temat selektywności mówimy o cytotoksyczności, a nie toksyczności. Toksyczność jest wobec zwierząt i ludzi, a nie wobec komórek.

4) Brakuje mi w doktoracie postulowanego mechanizmu organokatalizy z udziałem związków otrzymanych w trakcie doktoratu. Bez mechanizmu trudno postulować działanie tych związków oraz wytłumaczyć kierunek indukowania nadmiaru enancjomerycznego. Dlaczego nie przeprowadzono modelowania przebiegu reakcji?

Chciałbym teraz przejść do najważniejszej konkluzji o tym, iż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska opisuje rozwiązanie niezwykle istotnych i aktualnych problemów badawczych, tak chemicznych, jak i biologicznych. Całościowy wkład tej rozprawy spełnia wymogi formalne, jak i zwyczajowe, które stawiane są przed tego rodzaju pracami przez odpowiednią Ustawę (w trybie przewidzianym w art. 179 ust. 7 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.).

W związku z tym z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne w Politechnice Wrocławskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Iwan do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Mając na uwadze liczny i niezwykle wartościowy dorobek publikacyjny i patentowy związany z tematyką badań doktoratu, wnoszę również o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Kierownik
Zakładu Chemii Medycznej

prof. dr hab. Adam Huczynski