

Prof. dr hab. Jacek Jemielity  
Laboratorium Chemii Bioorganicznej  
Centrum Nowych Technologii  
Uniwersytet Warszawski  
e-mail: [j.jemielity@cent.uw.edu.pl](mailto:j.jemielity@cent.uw.edu.pl)  
tel. 22 5543774

Warszawa 17.06.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Chrabąszcz**

**p.t. „Synteza i aktywność biologiczna metaloorganicznych pochodnych kwasu foliowego oraz wybranych inhibitorów polimeryzacji tubuliny”**

Choroby nowotworowe to w krajach rozwiniętych jeden z największych problemów cywilizacyjnych naszych czasów. Pomimo wielu osiągnięć w obszarze terapii i diagnostyki przeciwnowotworowej, wciąż śmiertelność chorób nowotworowych jest bardzo wysoka. Aktualnie stosowane w terapiach leki przeciwnowotworowe często mają ograniczoną efektywność oraz wykazują często niepożądane skutki uboczne wynikające z braku selektywności ich działania. Dlatego poszukiwanie nowych rozwiązań w tym obszarze lub modyfikowane istniejących leków z myślą o poprawie ich właściwości biologicznych jest niezwykle potrzebne i cenne. Tematyka rozprawy doktorskiej przygotowanej przez mgr Karolinę Chrabąszcz wykonanej w Katedrze Chemii Organicznej, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. prof. Uł. Damiana Plażuka oraz dr Błażeja Rychlika jako promotora pomocniczego wpisuje się w ten nurt badawczy. Przedstawiona mi do recenzji praca obejmuje syntezę i badania wpływu grupy metalocenowej na właściwości biologiczne wybranych inhibitorów polimeryzacji tubuliny oraz pochodnych kwasu foliowego i metotreksatu, czyli inhibitorów biosyntezy komponentów niezbędnych do powstawania kwasów nukleinowych w komórkach.

Motywacja do wprowadzania modyfikacji do istniejących już leków, jest z reguły powiązana z chęcią modyfikacji ich właściwości terapeutycznych, zarówno farmakodynamicznych jak i farmakokinetycznych. Wprowadzane modyfikacje mogą zmieniać oddziaływania związków z celami

terapeutycznymi lub też wpływać na ich przenikalność przez błony komórkowe, a także zmieniać metabolizm w organizmie pacjenta. Dlatego ważne jest aby wprowadzanym modyfikacjom towarzyszyły jak najobszerniejsze badania wpływu modyfikacji na układ biologiczny. Takie podejście nawet jeśli nie rozwiązuje problemu pozwala na zgromadzenie wiedzy niezbędnej do poznawania złożonych mechanizmów działania terapeutyków, a co za tym idzie dalszego ich udoskonalania.

Praca doktorska mgr Karoliny Chrabąszcz została przygotowana w formie tradycyjnej rozprawy i ma układ klasyczny, typowy dla prac eksperymentalnych z chemii z elementami nauk pokrewnych. Rozprawa jest napisana w sposób zwięzły i merytoryczny. Na 195 stronach tej rozprawy opisano wstęp teoretyczny, badania własne oraz część eksperymentalną. Dodatkowo wyodrębniono, cel pracy, na końcu rozdziału „Badania własne” znajduje się zwięzłe podsumowanie uzyskanych rezultatów, a na końcu rozprawy listę prac wchodzących do dorobku autorki oraz osiągnięć związanych z realizacją doktoratu. W pracy zamieszczono 65 rysunków, 46 schematów oraz 10 tabel, starannie przygotowanych pod względem edytorskim (choć z pewnymi zastrzeżeniami, o których wspomnę później). Elementy te są bardzo pomocne w zrozumieniu zagadnień poruszanych w rozprawie oraz doskonale obrazują uzyskane rezultaty. W pracy zacytowano 171 pozycji literaturowych, które w znakomitej większości stanowią prace oryginalne oraz przeglądowe opublikowane w wiodących czasopismach naukowych z chemii, biochemii, biologii molekularnej i medycyny.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pani mgr Karoliny Chrabąszcz dotyczy wykorzystania metalocenów do modyfikacji leków przeciwnowotworowych. Jako obiekty poddawane modyfikacjom Doktorantka wybrała w pierwszej kolejności etopozyd oraz tryprostatynę A. Mechanizm działania tych leków jest dość złożony, a wspólną ich cechą jest to, że wykazują aktywność wobec topoizomerazy II, enzymu zaangażowanego w rozcinanie i ligację DNA. Proces ten jest kluczowy podczas podziałów komórkowych i prowadzi do rozluźniania chromatyny, co niezbędne w replikacji materiału genetycznego. Tryprostatyna A dodatkowo hamuje proces polimerazacji tubuliny. Polimeryzacja tubuliny jest kolejnym kluczowym procesem podczas podziałów komórkowych. Kolejne obiekty, które były poddawane przez doktorantkę modyfikacjom to kwas foliowy oraz metotreksat. Kwas foliowy jest kofaktorem niezbędnym dla działania reduktazy dihydrofolianowej, enzymu zaangażowanego w syntezę m. in. monofosforanu tymidyny, który dalej przekształcany do trifosforanu tego nukleozydu, substratu do syntezy DNA. Zablokowanie aktywności reduktazy dihydrofolianowej, prowadzi więc do zahamowania syntezy DNA, co ma szczególny wpływ na komórki szybko dzielące się, do których należy wiele komórek nowotworowych. Jedną ze skutecznych metod wpływania na ten proces jest wykorzystanie metotreksatu który jest strukturalnie podobny do kwasu foliowego. Wspólną cechą wszystkich wybranych przez doktorantkę substancji do modyfikacji jest to, że wpływają one na procesy związane z podziałami komórkowymi. Skuteczność tego typu terapeutyków wynika z faktu, że wiele typów nowotworów ma istotnie przyspieszoną kinetykę podziałów komórkowych, więc siłą rzeczy

terapeutyki celujące w hamowanie tych procesów, w większym stopniu hamują komórki nowotworowe niż zdrowe. Nie mniej jednak, tego typu terapie oddziałują również na komórki i tkanki zdrowe, co wiąże się z występowaniem niepożądanych skutków ubocznych, często poważnych. Sprawia to, że poszukiwanie analogów o poprawionych właściwościach terapeutycznych jest jak najbardziej sensowne. Zanim Doktoratka przeszła do opisu uzyskanych rezultatów przedstawiła w rozdziale zatytułowanym „Przegląd literatury” stan wiedzy istotny z punktu widzenia prowadzonych przez nią badań. W rozdziale tym Doktorantka opisuje mechanizmy komórkowe związane z aktywnością wybranych grup terapeutyków, przedstawia rys historyczny odkrywania istotnych związków, które znalazły zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych. W dalszej części przedstawia elementy rozwoju chemii biometaloorganicznej zwracając najwięcej uwagi chemii i wykorzystaniu metalocenów, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości przeciwnowotworowych związków z tej grupy. Ten rozdział napisany jest dobrze, w sposób zwięzły opisano zagadnienia istotne dla tematyki rozprawy doktorskiej. Najwięcej kontrowersji budzi wstęp do tego rozdziału, w którym Doktorantka opisuje aktualne strategie leczenia nowotworów. Wydaje mi się, że te strategie wymienione przez doktorantkę znane są od dziesięcioleci i natomiast nie zostały uwzględnione najnowsze osiągnięcia w terapiach przeciwnowotworowych, które obecnie z powodzeniem są stosowane i coraz częściej wypierają starsze metody. W szczególności zabrakło odniesień do leków biologicznych, które w ostatnich latach są na czele list terapeutyków przynoszących największe dochody firmom farmaceutycznym. Prosiłbym Doktorantkę o uzupełnienie stosowanych strategii terapii przeciwnowotworowych o bardziej aktualne przykłady podczas publicznej obrony.

W rozdziale „Badania własne” Doktorantka opisuje syntezę analogów wspomnianych wcześniej powszechnie znanych i stosowanych leków przeciwnowotworowych. W ramach tych badań mgr Chrabąszcz otrzymała dwie serie analogów etopozydu modyfikowane ugrupowaniami ferrocenyłowymi lub rutenocenyłowymi otrzymanymi przy wykorzystaniu reakcji CuAAC oraz pochodne aminowe. Otrzymane związki zbadano pod kątem właściwości biologicznych, testując potencjał otrzymanych związków do hamowania podziałów komórkowych w liniach nowotworowych. Doktorantka ze wsparciem współpracowników pokazała, że najaktywniejsze są związek **220** (z serii triazolowej) oraz związki **258-260** (z serii aminowej). Co ciekawe aktywność wykazały w zasadzie jedynie analogi ferrocenyłowe, podczas gdy rutenocenyłowe były nieaktywne. W kolejnym kroku podjęto próbę weryfikacji mechanizmu według, którego związki te działają na procesy komórkowe. Na podstawie wyników badań biologicznych Doktorantka stwierdziła, że jedynie związek **258** wykazuje podwójne działanie, czyli jest zarówno inhibitorem polimeryzacji mikrotubul, jak i topoizomerazy II. Ta część badań opisanych w doktoracie w moim odczuciu przyniosła najciekawsze rezultaty z punktu widzenia aktywności biologicznej. Natomiast jeśli chodzi o dyskusję wyników, wykazanie pewnych zależności pomiędzy strukturą i aktywnością, to tu Doktorantka wykazała się bezpiecznym podejściem

minimalistycznym. To o tyle zaskakujące, że akurat te wyniki zostały już opublikowane i w publikacji te aspekty są głębiej dyskutowane. To o tyle istotne, że zrozumienie takiej zależności między strukturą i aktywnością biologiczną pozwala racjonalnie projektować struktury kolejnych związków o zwiększonej aktywności biologicznej.

Kolejnym zadaniem postawionym przed Doktorantką była synteza serii ferrocenylowych oraz fenylowych analogów tryprostatyny A. Wydaje mi się, że w tej z kolei części w Doktorantka zmierzyła się z najpoważniejszymi wyzwaniami syntetycznymi i pod tym względem jest ona najciekawsza. Badania aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków w stosunku do linii komórek nowotworowych wrażliwych oraz opornych na najczęściej stosowane chemoterapeutyki (cisplatynę, doksorubicynę, etopozyd, metotreksat, winkrystynę i mitoksantron) pokazały, że związki te nie wykazują istotnej aktywności, natomiast po potraktowaniu komórek mieszaniną pochodnych tryprostatyny A i leku następuje uwrażliwienie komórek nowotworowych na zastosowany chemoterapeutyk. Te wyniki sugerowały zahamowanie transporterów ABC (ATP-binding cassette transporter), które są często odpowiedzialne za oporność na pewne rodzaje terapii, co wynika z aktywnego usuwania terapeutyku z komórek. Doktorantka ze współpracownikami zbadała wpływ zsyntezowanych związków na transport wzorcowych substratów wybranych białek oporności wielolekowej oraz dodatkowa weryfikacja przy użyciu testu opartego na specyficznych przeciwciałach. Otrzymane wyniki potwierdziły tę hipotezę, związki **(Z)-273**, **(Z)-296** i **(Z)-275** oddziaływały z białkami ABCB1 oraz ABCG2, natomiast związek **(Z)-295** blokował jedynie białko ABCG2.

Doktorantka zsyntezowała również serię ferrocenylowych analogów kwasu foliowego oraz metotreksatu, które poddano badaniom komórkowym, jednak nie udało się wykazać ich istotnej aktywności antyproliferacyjnej.

Warty podkreślenia jest szeroki repertuar metod analitycznych i spektroskopowych służących potwierdzeniu struktury i czystości otrzymywanych związków, w tym produktów końcowych, które były poddawane badaniom biologicznym. Doktorantka wykorzystywała do tego celu różne techniki NMR, MS, IR oraz analizę elementarną, w niektórych przypadkach uzyskano również struktury krystalograficzne. Opis widm NMR to moim zdaniem mocna strona rozprawy. Doktorantka bardzo umiejętnie posługiwała się również widmami NMR podczas interpretacji efektów prowadzonych reakcji, potwierdzając ich przebieg zgodnie z założeniami, diagnozując problemy syntetyczne, takie jak nietrwałość poszczególnych półproduktów, czy obserwując ciekawe aspekty strukturalne niektórych związków. Wiele widm zostało zamieszczonych w treści rozprawy co bardzo ułatwia weryfikację stawianych przez doktorantkę tez. Jedną z takich ciekawostek jest istnienie rotamerów związku **278**. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować prosty eksperyment NMR potwierdzający, że mamy rzeczywiście doczynienia z rotamerami tego związku, a nie na przykład izomerami? Jaki to byłby eksperyment i jakie spodziewane byłyby jego rezultaty.

Przykry obowiązek recenzenta to również wykazanie słabości rozprawy przedstawionej do oceny, tych na szczęście w recenzowanej pracy jest niewiele. Kilka problemów na które chciałem zwrócić uwagę Doktorantki obejmuje następujące zagadnienia:

- Cele pracy przedstawiono w pracy w sposób, który nie dokońca wydaje mi się właściwy. Doktorantka wymienia krótko co było celem pracy, a następnie opisuje sposoby ich osiągnięcia. Znacznie bardziej zasadne w tym miejscu, byłoby opisanie motywacji do ich podjęcia i tego elementu motywacyjnego zabrakło mi w recenzowanej pracy.
- Od strony edytorskiej praca jest przygotowana starannie, jednak niektóre z elementów schematów i rysunków są zbyt mało czytelne aby były użyteczne, przykładowo numery związków są zbyt małe, a już najbardziej ekstremalnym przykładem braku czytelności jest Tabela 4 na stronie 79.
- W podsumowaniu wyników dotyczących badań nad blokowaniem transporterów ABC Doktorantka nazywa związki wykazujące aktywność w tym kierunku substratami co wydaje się określeniem niewłaściwym.
- Na stronie 85 autorka napisała: „Ponadto zaobserwowałam, że izomer Z posiada wyższe powinowactwo do transportera w porównaniu z izomerem E.” Unikałbym używania wartościowania powinowactwa przy braku ilościowych wyników badań oddziaływania związków z danym białkiem. Obserwacja z badań komórkowych może wynikać z wielu innych czynników, niż samo powinowactwo ligand-białko. Aby to definitywnie stwierdzić należałoby zastosować techniki biofizyczne pozwalające na zbadanie stałych dysocjacji (lub asocjacji) białko-ligand.
- lista referencji wymaga pewnego ujednoczenia w kontekście pisowni nazw czasopism oraz tytułów cytowanych artykułów (konsekwentne stosowanie dużych i małych liter).
- Błędnie nazwano jednostkę Uniwersytetu Warszawskiego, w której pracuje dr hab. Anna Makal odpowiedzialna za badania krystalograficzne w przedstawionej rozprawie. Prawidłowa nazwa tej jednostki to Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, a nie Centrum Badań Biologiczno-Chemicznych (str. 72, 74 i 77)

Wymienione mankamenty nie obniżają wartości naukowej dysertacji oraz jej oryginalności, a ich przywołanie w recenzji ma spełniać walor dydaktyczny, co mam nadzieję Doktorantka zechce wykorzystać w dalszej karierze naukowej.

Warto podkreślić, że bogaty materiał doświadczalny, uzyskany podczas realizacji pracy obejmuje zarówno rozwijanie metod syntezy chemicznej modyfikowanych czynników przeciwnowotworowych, jak również analizę spektroskopową uzyskanych produktów i w końcu badania komórkowe. Rozprawa wnosi istotny wkład w badania nad wykorzystaniem metalocenów do modyfikowania związków biologicznie aktywnych i z całą pewnością zdobyta wiedza będzie użyteczna w projektowaniu związków o jeszcze lepszych właściwościach biologicznych. Dorobek Kandydatki uważam za istotny, szczególnie pierwszoautorską pracę opublikowaną w *Chemistry - A European*

Journal poświęconą ferrocenyłowym i rutenocenyłowym analogom etopozydu uważam za dowód jej dojrzałości jako młodego naukowca. Dodatkowo, w ocenie aktywności naukowej Doktorantki warto zwrócić uwagę na dużą aktywność konferencyjną Kandydatki, odzwierciedloną licznymi wystąpieniami na konferencjach krajowych i zagranicznych.

W konkluzji, stwierdzam że przedstawiona mi do oceny rozprawa stanowi bogaty i oryginalny materiał doświadczalny, cenny z punktu widzenia dalszych prac nad metalocenowymi analogami leków przeciwnowotworowych o znaczeniu terapeutycznym, o poprawionych właściwościach biologicznych. Rozprawa wnosi istotny wkład w zrozumienie jak modyfikacje metalocenowe mogą wpływać na terapeutyczne właściwości chemoterapeutyków. W związku z powyższym z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Karoliny Chrabąszcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, reading "Jacek Jemielniak". The signature is written in a cursive style and ends with a long, sweeping underline that extends to the right.