

Poznań, dnia 31 października 2024 roku

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Kowalczyk**„Synteza i aktywność biologiczna
metaloorganicznych koniugatów inhibitorów
kinezy-5”**

Tryb życia społeczeństw krajów rozwiniętych (dieta, brak aktywności fizycznej) oraz czynniki środowiskowe są uważane za genezę chorób ogólnie nazywanych cywilizacyjnymi. W powszechnej opinii choroby cywilizacyjne to głównie choroby serca i układu krążenia, choroby metaboliczne, układu oddechowego, autoimmunologiczne, neurodegeneracyjne i zaburzenia psychiczne. Szacunki WHO wskazują na choroby cywilizacyjne jako przyczyny 70% zgonów, ale jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych, są choroby nowotworowe, z których niektóre, takie jak rak płuc, jelita grubego, żołądka i wątroby, również są zaliczane do chorób cywilizacyjnych.

Spśród terapii przeciwnowotworowych, chemioterapia (często w połączeniu z metodami radykalnymi) jest kluczowym sposobem leczenia, niestety niepozbawionym wad. Głównymi wadami chemioterapii są: działanie toksyczne na komórki zdrowe, odporność wielolekowa, leukopenia. Stąd prace nad udoskonaleniem leków onkologicznych są istotnym nurtem badań, nie tylko w laboratoriach potentatów branży farmaceutycznej.

Mechanizmy działania leków przeciwnowotworowych są zróżnicowane, tak jak i zróżnicowane są struktury odpowiednich indywiduów chemicznych. Jakkolwiek głównym źródłem substancji wiodących w poszukiwaniach nowych leków onkologicznych są produkty pochodzenia naturalnego, to fragmenty zawierające w strukturze atom lub kation metalu stanowią interesującą alternatywę (modyfikację) szkieletu cząsteczki potencjalnego terapeutyka. Jedną z takich modyfikacji może być wprowadzenie do struktury związku organicznego fragmentu metalocenu, w tym najpopularniejszego (o ile tak można powiedzieć o związku chemicznym), mianowicie ferrocenu.

Temu zagadnieniu, czyli modyfikacjom fragmentem ferrocenu szkieletów cząsteczek związków organicznych o znanej aktywności biologicznej została poświęcona praca doktorska mgr

Karoliny Kowalczyk. Praca ta została wykonana pod opieką prof. Uł, dr. hab. Damiana Płażuka, na

Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, czyli w ośrodku i w grupie mającej doświadczenie i osiągnięcia w chemii metalocenów.

Przedstawiona do recenzji dysertacja ma obecnie już typową dla tego rodzaju opracowań postać komentarza do publikacji współautorstwa Kandydatki. Całościowy dorobek naukowy Kandydatki mogę ocenić jako adekwatny do etapu kariery naukowej, zwłaszcza biorąc pod uwagę wielowątkowość i kompleksowość badań w których Autorka brała udział. Z recenzenckiego obowiązku dodam, iż mgr Kowalczyk jest współautorką 5 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i o uznanej renomie. Ponadto była współautorką 10 komunikatów konferencyjnych, w większości były to prezentacje posterowe. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Kowalczyk była wykonawczynią w grantie kierowanym przez Promotora, ale — co ważniejsze — również pozyskała finansowanie na swoje badania. O ile jeszcze kilkanaście lat temu nie byłoby to niczym szczególnym, to obecnie, przy nierzadko jednocyfrowym współczynniku sukcesu, fakt zdobycia finansowania zasługuje na uznanie.

Postawiona hipoteza badawcza zakładała zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej hybryd zbudowanych ze szkieletu związku organicznego połączonego z fragmentem ferrocenu. Mechanizm działania miał bazować na synergii cytotoksycznej aktywności ferrocenu oraz selektywnego hamowania aktywności kineazy-5 i indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych poprzez modyfikowane metalocenem wybrane substancje wiodące: monastrol, CPUYL064 oraz ispinesib.

Jako podstawę opracowania mgr Kowalczyk wybrała 3 prace opublikowane w czasopismach Dalton Transactions (2 prace) i Chemistry — A European Journal, które opatrzyła komentarzem. Na tenże składają się dwie zasadnicze części. Pierwsza z nich jest omówieniem związków o aktywności przeciwnowotworowej. Tematyka ta — bardzo obszerna nota bene — została zgrabnie zredukowana do omówienia właściwie trzech grup związków, wprawdzie różniących się znacząco strukturalnie, ale charakteryzujących się podobnymi właściwościami, t.j. związków antymitotycznych; związków metaloorganicznych o aktywności biologicznej (ze szczególnym uwzględnieniem ferrocenu), stosowanych w przeszłości i obecnie w różnorodnych terapiach; oraz związków będącymi inhibitorami białek motorycznych (kineazy-5). Wśród tych ostatnich zostały omówione również monastrol, CPUYL064 oraz ispinesib, co tym samym uzasadnia wybór tych związków jako substratów do dalszych modyfikacji.

Druga część komentarza odnosi się bezpośrednio do prac współautorstwa mgr Kowalczyk, które zostały wybrane jako podstawa pracy doktorskiej. Muszę tu nadmienić, że zarówno te jak i pozostałe prace, nie będące podstawą doktoratu, są publikacjami wieloautorskimi. Liczba autorów waha się od 5 do 11, stąd komentarz miał podkreślać rolę mgr Kowalczyk w prowadzonych badaniach. Dodatkowo, każdy ze współautorów złożył stosowne oświadczenie odnośnie zakresu prac realizowanych w każdej z publikacji stanowiącej podstawę doktoratu. Ze względu na fakt,

iż publikacje zostały wcześniej poddane wnikliwej analizie, rola recenzenta sprowadza się właściwie do określenia czy prezentowany dorobek naukowy upoważnia do skierowania wniosku o nadanie stopnia doktora.

Pozostając przy kwestiach formalnych — pomijając formę czasowników, komentarz jest napisany prawidłowym językiem i czyta się go z przyjemnością. Zaledwie kilkakrotnie spotkałem się z użyciem żargonu laboratoryjnego (chiralna kolumna, protony metylenów, struktura krystaliczna, rozdział chiralny, itp.). Lepszym pomysłem byłoby użycie gwiazdki wskazującej na centrum stereogeniczne (Schemat 14) niż oznaczenia (R,S), które wskazuje na racemat, ale są to nieliczne uchybienia, które zauważyłem. Natomiast forma bezosobowa, którą z upodobaniem stosuje Autorka, nie jest tu najszcześniejszym wyborem.¹ Zdaję sobie sprawę, że w wielu tutorialach zaleca się dyplomantom używanie form bezosobowych, natomiast komentarz jednoznacznie powinien wskazywać na rolę i osiągnięcia Autorki. Stąd przyjąłem, zresztą zgodnie z oświadczeniami, że głównym obszarem zainteresowań Kandydatki było planowanie i synteza odpowiednich pochodnych.

Nie wchodząc w detale, które zostaną z pewnością omówione podczas publicznej obrony — tak jak to zostało wspomniane wcześniej, prace prowadzone przez Doktorantkę miały na celu wprowadzenie do szkieletu trzech związków modelowych fragmentu ferrocenu, celem zmodyfikowania ich aktywności biologicznej.

Pierwszą badaną grupę stanowiły pochodne monastrolu lub jego analogu, w którym atom siarki wiązania C=S został zastąpiony atomem tlenu. Większość z otrzymywanych związków syntezowana była de novo, a modyfikacje polegały na formalnym zastąpieniu grupy 3-hydroksyfenylowej podstawnikiem ferrocenylovym i jego pochodnymi, lub na zastąpieniu grupy 4-metylowej w monastrolu grupą ferrocenylovą (i jej pochodnymi). Pochodne pierwszego typu otrzymywane były w reakcji Biginelliego w obecności katalitycznych lub stechiometrycznych ilości kwasu Lewisa. W przypadku drugiego typu związków konieczne było otrzymanie półproduktów — w postaci odpowiednich ketoestrów, a docelowe związki otrzymane zostały ze zróżnicowaną wydajnością. Otrzymane pochodne nie straciły aktywności związku wyjściowego — monastrolu, a generowanie reaktywnych form tlenu może być alternatywnym lub wspomagającym mechanizmem działania przeciwnowotworowego.

Ferrocenylove analogi CPUYL064 otrzymane zostały w reakcjach wykorzystujących, m.in. chemię enolanów. Podobnie jak to miało miejsce w przypadku pochodnych monastrolu, większe wydajności produktów uzyskane zostały, gdy reakcje prowadzone były w reaktorze mikrofalowym. W przypadku podstawienia ferrocenem analogów CPUYL064, otrzymane związki wykazywały większą

1 Za Zintegrowaną Platformą Edukacyjną Ministerstwa Edukacji Narodowej: „... (bezosobowe) formy czasownika mają zastosowanie w sytuacji, gdy nie można wskazać wykonawcy czynności (np. w opisach zjawisk przyrodniczych czy stanów, które dotyczą organizmu człowieka) oraz wtedy, gdy celowo unika się wskazania wykonawcy czynności (np. Zorganizowano zbiórkę pieniędzy).”

aktywność w porównaniu do wyjściowego CPUYL064, ale nie wykazywały zdolności do generowania reaktywnych form tlenu.

Struktura ispinesibu pozwala na większy zakres zmian struktury, mianowicie na formalne zastąpienie grupy toluiłowej i aminopropylowej podstawnikami zawierającymi ferrocen, podstawienie wyłącznie grupy aminopropylowej i wreszcie na modyfikacji fragmentu amino propylowego. Substratami był zarówno racemiczny jak i optycznie czynny ispinesib. Otrzymane koniugaty charakteryzowały się zwiększoną aktywnością biologiczną względem związku wyjściowego, przy czym postulowany mechanizm aktywności to nie tyle zdolność do hamowania aktywności kinazy, ale indukcja stresu oksydacyjnego, o czym świadczą obserwowane rozbieżności pomiędzy eksperymentem a wynikami dokowania,

Jak wspomniałem wcześniej, prace stanowiące podstawę dysertacji były recenzowane, tym niemniej po ich lekturze nasuwają się pewne pytania. Pierwsze z nich, związane jest z warunkami prowadzonych syntez, a konkretnie koniecznością użycia kwasów Lewisa jako promotorów reakcji. Czy oznaczane były pozostałości metali w próbkach badanych pod kątem ich aktywności biologicznej? Zarówno monastrol jak i ispinesib zawierają w strukturze elementy chiralności. W przypadku tego ostatniego otrzymane zostały obydwie enancjomery, ale w reakcjach następowała częściowa racemizacja. Zgodnie z wynikami dokowania konfiguracja może odgrywać znaczenie w szacowaniu aktywności biologicznej pochodnych ispinesibu. Jaką czystość enancjomeryczną miały później badane próbki?

W przypadku analogów monastrolu, badane związki były racematami. Czy poza wynikami dokowania, można wykazać eksperymentalnie, która z form enancjomerycznych jest bardziej aktywna? I jaka jest szacowana stabilność konfiguracyjna centrum stereogenicznego?

Zarówno z lektury komentarza jak i oświadczeń wynika, że aktywność Doktorantki była skupiona na syntezie związków modelowych, które następnie badano pod kątem założonej aktywności biologicznej. Widoczna jest biegłość Doktorantki w planowaniu i przeprowadzeniu syntez. Ze względu na zaangażowanie różnych grup badawczych i wielowątkowość badań prowadzonych w zespole prof. Plażuka, fragment „chemiczny” stanowi jeden z aspektów prowadzonych prac. Nie wdając się w dywagacje czyje wyniki są ważniejsze, należy podkreślić fakt, iż niezależnie od wkładu pozostałych autorów, bez udziału Doktorantki prace stanowiące podstawę dysertacji by nie powstały.

Stwierdzam, że oceniana praca spełnia warunki stawiane przez ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, co upoważnia mnie do skierowania wniosku do Komisji ds. Stopni Naukowych Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Karoliny Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego,



Marcin Kwit