



UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

PROF. DR HAB. LUCJUSZ ZAPRUTKO

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel. 061 854 66 70

fax 061 854 66 80

e-mail: zaprutko@ump.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **mgr chem. Angeliki Anny Adamus-Grabickiej**
zatytułowanej

„Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin
skondensowanych z chromanonem lub flawanonem: synteza i badanie
właściwości fizykochemicznych”,

wykonanej pod opieką naukową prof. dr hab. n. farm. Elżbiety Budzisz
– jako promotora,

w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych

Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Flawonoidy to jedne z najszerzej rozpowszechnionych związków w świecie roślinnym, występujące w wielu ich rodzinach i charakterystyczne dla wielu gatunków. Oczywiście więc rzeczą jest, że są one obecne również w najróżniejszych przetworach pozyskanych z tych roślin, spośród których znakomita część ma znaczenie i zastosowanie spożywcze, lecznicze czy kosmetyczne. Flawonoidy są wiodącym elementem szerszej grupy związków nazywanych polifenolami. Same zaś podzielone zostały na kilka grup ze względu na ich szczegółową budowę chemiczną. Ich wspólny podstawowy szkielet ma budowę diarylopropanową typu C6-C3-C6. Wszystkie one, z wyłączeniem pokrewnych im chalkonów, są związkami heterocyklicznymi z atomem tlenu, tworzącym układ piranowy. Ze względu na obecność w ich cząsteczkach wielu miejsc reaktywnych, mogą one występować w niezwykle szerokiej gamie pochodnych. A każda z tych pochodnych może jeszcze łączyć się z cząsteczkami cukrów, tworząc co najmniej kilka różnych glikozydów. Stąd też nieprzebrane bogactwo związków flawonoidowych jakimi obdarzyła nas przyroda, a zwielokrotnione to zostało jeszcze przez chemików tworzących kolejne zbiory półsyntetycznych pochodnych tych substancji. Pierścień piranowy flawonoidów w większości przypadków wzbogacony jest o dodatkowy, egzocykliczny atom tlenu obecny w postaci grupy karbonylowej, zajmującej zazwyczaj pozycję C-4, co prowadzi do utworzenia w ten sposób układu γ -pironu. Fakt, że wszystkie te związki wykazują jakieś działanie biologiczne stał się przyczyną powstania chyba już milionów prac naukowych im poświęconych. Wśród najważniejszych ich cech biologicznych wymienić należy działanie immunomodulujące, przeciwmiażdżycowe, antyagregacyjne, przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, hipotensyjne i dwa najważniejsze: antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe. Dlatego problem wykorzystania układu flawanonu i macierzystego względem niego chromanonu jako nośnika nowych czy też udoskonalonych właściwości biologicznych, będących konsekwencją wprowadzenia do niego

nowych niespecyficzných układów heterocykliczných, wydaje się być niezwykle interesujący i ważny z praktycznego punktu widzenia, gdyż niosący w sobie ogromny potencjał możliwości aplikacyjnych, i to nie tylko w kierunku wskazanym w dysertacji. Powyższe fakty upoważniają mnie do stwierdzenia, że temat pracy doktorskiej został bardzo celnie wybrany, a jej konsekwentny sposób realizacji zarówno w części chemicznej jak i w biologicznej, pozwolił osiągnąć zamierzony cel i udowodnić wiodącą hipotezę badawczą w znacznie poszerzonym zakresie. Autorka bowiem, rozdział „Cel pracy” rozpoczyna zwięzłym zdaniem wskazującym syntezę i ocenę aktywności cytotoksycznej jako wiodące zadanie. Dalej jednak doprecyzowuje ów cel w „Szczegółowych założeniach”, które wskazują na pełen zakres prowadzonych badań. Część poświęcona omówieniu wyników w pełni dokumentuje realizację wszystkich zaplanowanych zadań, których efekty zostały opublikowane w cieszących się dużym uznaniem czasopismach chemicznych oraz opisane w formie komentarzy do tych artykułów, tworzących łącznie coś na kształt monografii.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr chem. Angeliki Anny Adamus-Grabickiej stanowi cykl trzech spójnych tematycznie publikacji o sumarycznej wartości IF = 6,365 (w tym jedna praca z IF = 0). Prace te łącznie uzyskały 150 punktów MNiSW (w tym 30 punktów przed rokiem 2019). W obydwu pracach z punktacją IF Doktorantka jest pierwszym autorem, w żadnej nie pełniła roli autora korespondencyjnego. Prace te, w każdym przypadku przedstawiono wraz z tzw. materiałami uzupełniającymi. Do każdej z tych prac dołączono krótki, 2-4 stronicowy komentarz, a ponadto całość poprzedzono wprowadzeniem literaturowym zawartym na 23 stronach, oraz dwustronicowym celem pracy przedstawionym w postaci 11 wypunktowanych „Szczegółowych założeń i etapów pracy”. Po zestawie publikacji Doktorantka zamieściła rozdział zatytułowany „Dyskusja”, gdzie na 6 stronach omawia uzyskane wyniki, a następnie na kolejnych 3 stronach zamieszcza zestaw 18 wniosków, i dalej streszczenie oraz wykaz piśmiennictwa. Powyższe elementy, uzupełnione pełnym zestawem oświadczeń współautorów opisujących merytorycznie ich stopień i rodzaj zaangażowania w powstanie przedmiotowych publikacji opracowano w zwartą monografię, a oddzielnie przedstawiono „Suplement” obejmujący szeroko pojęty życiorys naukowy Kandydatki oraz ponownie zestaw odbitek publikacji stanowiących podstawę postępowania doktorskiego.

W odczuciu oceniającego, cenne jest zamieszczenie w przedstawionej dysertacji odbitek publikacji wraz z materiałami uzupełniającymi, jednak zupełnie zbędne jest ich dublowanie w dziele podstawowym i w Suplemencie.

Powszechnie przyjęte jest, że recenzent powinien wskazać na dominujący udział Doktoranta w powstaniu pracy. W przypadku tych wieloautorskich prac stwierdzenie takie byłoby trudne do uzasadnienia. Jednak z całą odpowiedzialnością mogę stwierdzić, że udział Doktorantki w powstawaniu tych prac był kluczowy, i bez Jej aktywności i działań w tym zakresie żadna z tych prac w ogóle by nie powstała. I to właśnie wskazuje dobitnie i w sposób absolutnie jednoznaczny na ową kluczową rolę „syntetyka” w kreowaniu dzisiejszego świata publikacji, zdominowanego przez rezultaty badań biologicznych realizowanych w różny sposób i w różnych ich modelach. Zgodnie z przyjętymi obecnie zasadami, udział autorski w powstawaniu owych publikacji nie został wyrażony w sposób liczbowy, ale właśnie z opisowych oświadczeń współautorów wynika owa kluczowa rola Doktorantki w powstaniu artykułów stanowiących podstawę tego doktoratu.

Recenzowana praca doktorska prezentuje, zgodnie z tytułem, syntezę, wyjaśnienie struktury oraz szerokie badania wybranych aspektów działania przeciwnowotworowego otrzymanych związków. Ponadto podjęto w niej cenne próby ustalenia pewnych zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością cytotoksyczną opisywanych produktów. Poza kluczowym dla przedstawianej dysertacji zadaniem syntezy i ustaleniem struktury, Doktorantka także oznaczyła dla badanych związków współczynniki podziału, współuczestniczyła w badaniach biologicznych i korelowała otrzymane wyniki w sposób

zgodny z regułami analizy QSAR. Przypatrując się tytułowi pracy można się zastanawiać czy wiodące nowe produkty to pirazoliny skondensowane z flawonoidami czy też odwrotnie flawonoidy skondensowane z pirazolinami. I choć to pierwsze określenie jest bardziej poprawne to to drugie jest bardziej „przemawiające” i „obrazowe”. Jednakże dla pełnego oddania zawartości publikacji wchodzących w skład dysertacji ja bym widział tytuł pracy doktorskiej rozbudowany o zwrot „... pochodnych benzylidenowych i spiro-pirazolinowych skondensowanych ...”. Rozumiem jednak formalny wymóg dążenia do jak najbardziej zwartego przedstawiania tytułu pracy. Uzyskany materiał doświadczalny, zarówno chemiczny jak i biologiczny, został w bardzo dobry sposób usystematyzowany i przyporządkowany do publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk farmaceutycznych. Poza pracami wchodzącymi w skład cyklu, Doktorantka opublikowała dwuczęściową pracę „Aktywność biologiczna związków flawonoidowych”, która mogłaby stanowić swego rodzaju wprowadzenie literaturowe do części typowo eksperymentalnej zawartej w publikacjach podstawowych dla tej dysertacji. A owe trzy prace „dysertacyjne” odzwierciedlają znakomicie trzy pozostałe elementy typowo eksponowane w monograficznych pracach doktorskich, tj. materiał i metody, uzyskane wyniki oraz ich dyskusję. W tym przypadku są to odpowiednio: pochodne benzylidenowe i ich aktywność (praca 1), pochodne spiro-pirazolinowe i ich aktywność (praca 3) oraz dokładne wyjaśnienie struktury badanych produktów przy zastosowaniu zaawansowanych metod refraktometrycznych (praca 2).

W pierwszej z prac zaliczonej do cyklu opisano syntezę 3-arylidenochromanonów z grupą dietyloaminową w pozycji para „podstawnikowego” pierścienia benzenowego, scharakteryzowano ich cechy fizykochemiczne, wyznaczono lipofilowość, oceniono wpływ na błonę komórkową erytrocytów, oznaczono cytotoksyczność względem wybranych linii komórkowych oraz określono zdolność wiązania się z albuminą surowicy krwi ludzkiej. Jako substratu do opisywanej tutaj reakcji użyto zarówno niepodstawionego chroman-4-onu jak również jego 2-fenyłową pochodną. Pozwoliło to na ciekawe obserwacje związane z występowaniem istotnej zawady przestrzennej w tym drugim przypadku oraz koniecznością specyficznego ułożenia pierścieni fenyłowych w pozycjach 2 i 3 względem siebie, dla zachowania stabilności cząsteczki. W pracy dokładnie rozważono i zinterpretowano fakt możliwego powstawania izomerów Z oraz E w wyniku zachodzącej reakcji, natomiast nieco mniej uwagi poświęcono możliwości występowania izomerów R i S pochodnej 2-fenyłowej. Ponadto, choć podstawnik dietyloaminowy uznawany jest na podstawie szerokich badań za jeden z korzystniejszych farmakoforów, to w moim odczuciu, w komentarzu do publikacji mogłoby się znaleźć szersze uzasadnienie wyboru takiego właśnie podstawnika, bowiem uzyskane w tej publikacji wyniki pozwoliły wskazać relatywnie korzystny kierunek do dalszych poszukiwań leków potencjalnie przeciwnowotworowych.

Druga praca eksperymentalna cyklu dotyczyła wyłącznie badań strukturalnych związków podobnego typu jak w pracy pierwszej, jednak różniących się podstawnikiem peryferyjnym, gdzie grupę dietyloaminową zastąpiono grupą hydroksylową. Dla związków o takiej strukturze przeprowadzono pełne badania krystalograficzne oraz oznaczono najważniejsze parametry lipofilowości. Mając zaś do dyspozycji te dane, określono interakcje międzycząsteczkowe z wykorzystaniem powierzchni Hirshfelda, co jest nieczęsto spotykanym podejściem analitycznym w rutynowych badaniach krystalograficznych. Pozwoliło to wyciągnąć wnioski na temat oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy takimi samymi molekułami, a tworzonych przez różnego typu wiązania wodorowe. Szkoda, że tak ciekawe wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie, które ze względu na swój specyficzny charakter nie posiada punktacji IF.

Trzecia z cyklu publikacji, pod względem chemicznym zdominowana jest przez otrzymane nowe pochodne spiro-pirazolinowe 3-benzylidenochromanonu. Oprócz syntezy tych niewątpliwie niezwykle oryginalnych indywiduali chemicznych i zaproponowanego mechanizmu ich powstawania Doktorantka opisuje również tutaj wyniki szeregu badań

fizykochemicznych oraz biologicznych przeprowadzonych dla tych właśnie związków. W efekcie tych eksperymentów o charakterze nieco zbliżonym do opisywanych w publikacji pierwszej, wyciąga ona wnioski o możliwości interkalowania otrzymanych związków z kwasami nukleinowymi, co w prostej linii prowadzi do wykazania aktywności przeciwnowotworowej. Cechy te, także tutaj, zostały skorelowane z wartościami logP określającymi lipofilowość otrzymanych produktów. Zależności te pozwoliły na wyciągnięcie wniosków zaprezentowanych w podsumowaniu pracy.

Przedstawione mi do oceny dzieło, to poza zestawem publikacji, także wspomniany wcześniej szeroki komentarz i dyskusja oraz wnioski będące efektem wspólnego i spójnego spojrzenia na wszystkie prace stanowiące ów monotematyczny cykl. W owej blisko sześciostronicowej dyskusji przedstawiono raz jeszcze efekty realizacji wszystkich celów szczegółowych, skupiając się przede wszystkim na analizie zależności struktura – aktywność, w odniesieniu do różnie definiowanego działania przeciwnowotworowego nowo syntetyzowanych cząsteczek. Rozdział „Wnioski” to 18 punktów nie zawsze będących w pełnym tego słowa znaczeniu wnioskami. W kilku przypadkach są to po prostu zdania w skrótowy sposób przedstawiające dokonania Doktorantki. A to dopiero owe dokonania powinny stać się źródłem wyciąganych z nich wniosków. I w końcu, jak zwykle w tego typu opracowaniach, ostatnim rozdziałem jest wykaz piśmiennictwa. I on wymaga pewnego komentarza, bowiem na 119 zacytowanych prac aż 24 (czyli około 20%) pochodzi z ubiegłego stulecia, a niektóre nawet z jego początku. Jednak w tym przypadku, proporcję tę uznaję za w pełni uzasadnioną charakterem opisywanych związków, które w swej macierzystej formie znane są już od znacznie ponad 100 lat. Wręcz brak owych „zabytkowych” pozycji piśmiennictwa uznać by można za swego rodzaju niedociągnięcie, którego Autorce udało się skutecznie uniknąć.

Po omówieniu zalet pracy zobligowany czuję się do wskazania także pewnych drobnych usterek i niedociągnięć w treści przedstawionego mi opracowania. Nie są to w żadnym wypadku „rażące błędy”, a jedynie swego rodzaju przeoczenia formalne, na które zwrócenie uwagi Autorki powinno zobligować ją do większej staranności w redagowaniu tekstów naukowych. I tak w kolejności pojawiania się ich w pracy, to:

- na Ryc. 4. na str. 17 zamiast nazwy Flawon powinna być Flawonol, a zamiast Dihydroflawanol powinna być Flawon,
- na str. 19 na Ryc. 6. obydwa związki mają strukturę 4H-, tyle tylko, że pierwszy z nich jest dodatkowo „dihydro”,
- Ryc. 7. na str. 20 jest w dużej mierze powtórzeniem Ryc. 3., ale skoro już jest, to powinna zawierać nazwy poszczególnych przedstawionych na niej struktur,
- na str. 20 w 8 wierszu od dołu nazwa 3-benzylideno-3-hydroksychroman-4-on jest niemożliwa; dla cząsteczki o takiej nazwie nie da się zapisać wzoru strukturalnego,
- str. 35 wiersz 4 od dołu, dyskusyjne jest czy atom wodoru można nazywać podstawnikiem,
- str. 36 wiersz 13 od góry, białaczka jest raczej „promielocytarna”,
- na stronie 48 ten sam układ raz jest nazywany „chroman-4-on” a kilka wersów dalej „4-chromanon”,
- stwierdzenie pod koniec strony 57 mówiące, że „związki o wyższej lipofilowości mogą być dobrymi kandydatami na leki” jest nie do końca spójne z wcześniej przytaczaną regułą Lipińskiego i ograniczeniem przez nią tego parametru do wartości 5.

Powyższym usterek towarzyszy jeszcze nieco tzw. błędów edytorskich, które nie mają wpływu na merytoryczną stronę pracy. I byłaby ona niemal idealna, gdyby nie wspomniane na wstępie zbędne zdublowanie kopii publikacji i przez to potrzeba podzielenia jej na dwa oddzielne woluminy.

Podsumowując, opublikowanie przez Doktorantkę wszystkich wyników badań w cenionych specjalistycznych czasopismach naukowych świadczy o dużej aktualności podjętej tematyki naukowej oraz wskazuje, że zaplanowane eksperymenty zostały dobrze przemyślane, zrealizowane i opisane. Z uznaniem należy podkreślić fakt, że stanowiąca główny cel pracy synteza nowych pochodnych kumaryny została znacznie wzbogacona o szeroki zestaw doświadczeń fizykochemicznych, biologicznych i obliczeniowych przez co praca nabrała jakże cennego charakteru interdyscyplinarności. Wskazuje to ponadto na zdolność organizacyjną Doktorantki w zakresie współuczestniczenia i współpracy w zespołach badawczych, skupiających się na umiejętnym, szerokim spojrzeniu na pojedynczy problem naukowy.

Wszystko to pozwala mi pozytywnie ocenić przedstawioną pracę doktorską Pani mgr Angeliki Anny Adamus-Grabickiej i jednoznacznie stwierdzić, że spełnia ona wszystkie wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, zawarte w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani magister Angeliki Adamus-Grabickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, prowadzących do uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Poznań, dnia 27 sierpnia 2020 r.

Prof. dr hab. n. farm. Lucjusz Zaprutko



Prof. dr hab. n. farm.
Lucjusz Zaprutko