

dr hab. n. farm. Małgorzata Jeleń, prof. SUM

Sosnowiec, 06.05.2023

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu

ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

manowak@sum.edu.pl

tel. 32 364 1604

Recenzja rozprawy doktorskiej

**pt.: „Fosfonianowe analogi kwasów amino(hydroksy)karboksylowych o potencjalnej
aktywności biologicznej”**

autorstwa Pani mgr inż. Liwii Lebelt

zrealizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Doroty G. Piotrowskiej, jako promotora,
w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Liwii Lebelt dotyczy zaprojektowania, syntezy, badań strukturalnych oraz oceny pod kątem aktywności agonistycznej wobec wybranych glutaminergicznych receptorów metabotropowych fosfonianowych analogów kwasów amino(hydroksy)karboksylowych.

Punktem wyjścia w projektowaniu struktury związków będących celem niniejszej pracy doktorskiej była aktywność biologiczna substancji posiadających w swojej strukturze kwas L-glutaminowy, jeden z dwudziestu podstawowych aminokwasów budujących białka. Aminokwas ten stanowi największy system neurotransmisyjny w ośrodkowym układzie nerwowym. W organizmach kwas glutaminowy odgrywa istotną rolę w biosyntezie puryn i pirymidyn oraz bierze udział w przemianie metabolicznej do L-glutminy przez syntetazę L-glutaminową (GS), co ma kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu komórek. Substancja ta reguluje pracę większości neuronów, a zmiany w aktywności tego neurotransmitera mogą prowadzić między innymi do epilepsji, depresji, lęków, schizofrenii oraz chorób neurodegeneracyjnych (płaszawica Huntingtona, choroby Alzheimera i Parkinsona). Kwas glutaminowy wywiera wpływ na dwa rodzaje receptorów glutaminergicznych: jonotropowe

(iGluR) i metabotropowe (mGluR). Doktorantka w swojej pracy skupiła się na badaniach związanych z tymi drugimi. Ze względu na znaczenie kwasu glutaminowego, pojawia się coraz większa ilość doniesień naukowych dotyczących różnorodnej aktywności biologicznej jego pochodnych posiadających dodatkowy podstawnik w pozycji γ oraz/lub ugrupowanie fosfonowe wprowadzone w miejsce grupy karboksylowej. W związku z powyższym podjęcie takiej tematyki rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadnione a także wpisuje się w tematykę badań zespołu naukowego, w którym została wykonana. Prowadzone przez Doktorantkę badania stanowią również ważny i aktualny, zarówno z punktu widzenia chemii medycznej jak i syntezy organicznej, wkład w badania nad stereoselektywną syntezą związków organicznych.

Opublikowany dorobek naukowy Doktorantki to osiem publikacji o łącznym wskaźniku IF wynoszącym 22,369 i punktacji MNiSW 870. Trzy spośród tych publikacji to prace bezpośrednio związane z tematyką pracy doktorskiej, w dwóch Doktorantka jest pierwszym autorem (*Molecules*, *UMedical Reports*). Pani mgr inż. Liwia Lebelt ma również w swoim dorobku naukowym cztery komunikaty zjazdowe (w trzech jest pierwszym autorem). Na uwagę zasługuje również udział Doktorantki, jako wykonawcy, w naukowo-badawczym projekcie NCN „beta-Laktamowe analogi przeciwwirusowych oksetanocyn”. Za swoją pracę naukową Doktorantka została dwukrotnie uhonorowana przez JM Rektora nagrodami naukowymi I stopnia. Jeżeli chodzi o działalność organizacyjną to Pani mgr inż. Liwia Lebelt była członkiem komitetu organizacyjnego 63 Zjazdu Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego, który odbył się w 2021 roku w Łodzi.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 146 stron, a jej układ i sposób edycji w pełni odpowiada oczekiwaniom stawianym pracom doktorskim. Pracę rozpoczyna spis treści oraz wykaz stosowanych skrótów (zawierający najważniejsze skróty i oznaczenia pojawiające się pracy). We wstępie Doktorantka przedstawia założenia i cele pracy poprzedzone opisem znaczenia substancji, które stały się punktem wyjścia do zaprojektowania tytułowych fosfonowych analogów kwasów amino(hydroksy)karboksylowych. Cele pracy zostały jasno zdefiniowane i poparte poprawnie postawioną hipotezą badawczą. Kolejna część pracy to wstęp literaturowy, w którym Doktorantka skupiła się na opisie występujących w przyrodzie pochodnych kwasu hydroksyglutaminowego, pochodnych kwasów 3- i 4-hydroksyglutaminowych o aktywności biologicznej, a także opisała wszystkie znane z literatury metody syntezy kwasów 3- i 4-hydroksyglutaminowych. Wstęp jest napisany na bardzo wysokim poziomie merytorycznym i bardzo dobrze się go czyta, a dołączone rysunki i

tabele dodatkowo dobrze obrazują treść pracy. Dobór zagadnień i literatury do tej części świadczy o doskonałej znajomości tematyki i posiadaniu rozległej wiedzy z opisywanego zakresu. Przeważającą część zacytowanych materiałów stanowią oryginalne, anglojęzyczne prace źródłowe. Całkowita liczba zacytowanych pozycji literaturowych w pracy wynosi 173. Kolejny rozdział, dotyczący omówienia wyników, Doktorantka rozpoczyna od przedstawienia założeń i planu swojej pracy, a następnie w sposób logiczny przedstawia uzyskane w trakcie badań wyniki. Wszystkie eksperymenty w pracy zostały przedstawione skrupulatnie i rzeczowo. Doktorantka w sposób logiczny planowała i wykonywała kolejne eksperymenty. W przypadku uzyskiwania niezadawalających wyników, Doktorantka wprowadza kolejne rozwiązania eksperymentalne, które prowadziły do optymalizacji warunków reakcji. W wyniku przeprowadzonych syntez Doktorantka otrzymała enancjomerycznie czyste kwasy (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowe (wszystkie możliwe cztery stereoizomery) oraz (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowe (wszystkie możliwe trzy stereoizomery). Otrzymanie wszystkich izomerów ma znaczenie ze względu na potencjalne aktywności biologiczne, ponieważ jak wiadomo stereoizomery różniące się konfiguracją absolutną mogą wykazywać inną aktywność biologiczną. Jako substraty do syntez Doktorantka zastosowała enancjomerycznie czyste (*R*)- i (*S*)-1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylofosfoniany dietylu, które w odpowiednich reakcjach przekształcała najpierw w izomeryczne (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu i w (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu. Na uwagę zasługuje otrzymanie enancjomerycznie czystych 1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylofosfonianów dietylu w zmodyfikowanej procedurze i opracowanie alternatywnej - szybszej i wydajniejszej ścieżki syntezy (*S*)-*N*-(1-fenyletylo)-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu. Ważnym zagadnieniem w syntezie enancjomerycznie czystych substancji jest opracowanie dobrej metody rozdziału diastereoizomerów. Doktorantka opracowała warunki efektywnego rozdzielania diastereoizomerycznych izoksazolidyn - produktów pośrednich w syntezie (*R*)- i (*S*)-1-(*N*-Boc-amino)-3-oksopropylofosfonianów dietylu wykorzystując technikę RP-HPLC. Dodatkowym atutem tego rozdziału była możliwość pominięcia dwóch etapów reakcji i zastosowania rozpuszczalników bardziej przyjaznych środowisku. Diastereoizomeryczne mieszaniny (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu Doktorantka przekształciła w pochodne *O*-acetylowe oraz *O*-4-nitrobenzoesowe w celu poprawy skuteczności rozdzielania ich za pomocą RP-HPLC. Podobnie, diastereoizomeryczne mieszaniny (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu wydzieliła z dobrymi


wydajnościami wykorzystując półpreparatywną wysokosprawną chromatografię cieczową w układzie odwróconych faz. Tytułowe kwasy difosfonowe Doktorantka otrzymała w wyniku hydrolizy (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów i (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu. Do ustalenia konfiguracji absolutnej odpowiednich (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonianów tetraetylu Doktorantka wykorzystwała regułę Spillinga analizy widm ^{31}P NMR ich odpowiednich estrów kwasu (*S*)-*O*-metylomigdałowego oraz przekształcając *N*-benzylo-3,5-bis(dietoksyfosfonylo)izoksazolidynę o znanej konfiguracji względnej *trans* w odpowiednie *anti*-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfoniany tetraetylu (*1R/S,3R/S*). Konfiguracje absolutne pochodnych benzyłowych Doktorantka ustaliła po przekształceniu [1,3-bis-(*N*-Boc-amino)prop-1,3-diylo]difosfonianów w enancjomeryczne (*1R,3R*)- i (*1S,3S*)-1,3-bis-(*N*-Boc-amino)prop-1,3-diylo]difosfoniany. W analogicznej reakcji estrów kwasów *syn*-(1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych Doktorantka otrzymała izomer *mezo*-[1,3-bis(tert-butoksykarbonyloamino)propano-1,3-diylo]difosfonianu tetraetylu. W tym miejscu należy podkreślić wkład pracy Doktorantki w syntezę związków będących tematem rozprawy. Wszystkie nowe substancje zostały otrzymane w kilkietapowych reakcjach, produkty pośrednie wymagały wydzielenia i scharakteryzowania. Dodatkowych eksperymentów i syntez wymagało także określenie konfiguracji absolutnej na atomie C3 nowych kwasów difosfonowych. Zakładaną budowę finalnych i pośrednich substancji otrzymywanych w ramach opisanych badań Doktorantka potwierdziła z pomocą technik IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR oraz analizy elementarnej. Doktorantka oznaczyła także temperatury topnienia (w przypadku ciał stałych), czas retencji oraz skręcalność właściwą. W tym miejscu nasuwa się pytanie czy Doktorantka próbowała wykonywać na którymkolwiek z etapów syntez analizę masową?

We współpracy z dr. Piotrem Brańskim Doktorantka oceniła aktywności otrzymanych, nowych kwasów (1-amino-3-hydroksypropano-1,3-diylo)difosfonowych ((*1R,3R*), (*1R,3S*), (*1S,3S*), (*1S,3R*)) oraz (1,3-diaminopropano-1,3-diylo)difosfonowych ((*1R,3R*), (*1S,3S*) oraz *mezo*) wobec glutaminergicznych receptorów metabotropowych: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈. Badane związki nie wykazały oczekiwanej aktywności agonistycznej wobec zastosowanych receptorów. Co skłoniło Doktorantkę do wyboru właśnie tych trzech receptorów? Spośród ośmiu glutaminergicznych receptorów metabotropowych wybrano właśnie: mGluR₅, mGluR₇ i mGluR₈ - nie przeprowadzono badań na żadnym receptorze z gr II a wybrano dwa z gr III.

W rozdziale 4 (podsumowanie) Doktorantka w przejrzysty i syntetyczny sposób dokonała podsumowania swoich badań, opisuje krok po kroku eksperymenty, które doprowadziły do udowodnienia hipotezy badawczej. W rozdziale 5 (wnioski) Doktorantka szczegółowo wypunktowała poczynione w trakcie badań obserwacje i wnioski, jakie z nich wyciągnęła. W kolejnym rozdziale, poświęconym procedurom eksperymentalnym, Doktorantka w sposób szczegółowy przedstawia opisy wszystkich wykonanych eksperymentów. W oparciu o zamieszczone informacje możliwe jest powtórzenie opisanych procedur. Kolejne dwa rozdziały w pracy to streszczenie napisane w języku polskim i angielskim. W wyniku realizacji zadań badawczych Doktorantka otrzymała wyniki mające charakter nowości naukowej. Praca doktorska mgr inż. Liwii Lebelt napisana jest w sposób jasny i przejrzysty, prezentuje bardzo dobry poziom merytoryczny. Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów językowych, które jednak nie umniejszają wysokiej wartości pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że mgr inż. Liwia Lebelt zrealizowała trudne zadanie badawcze z zakresu syntezy i rozdziału optycznie czynnych substancji organicznych o potencjalnej aktywności w różnorodnych chorobach układu nerwowego. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością nowoczesnych metod syntezy oraz analizy związków organicznych, praca napisana jest na wysokim poziomie merytorycznym, a wyniki w niej zawarte mają wpływ na rozwój dyscypliny. Praca ma oryginalny oraz nowatorski charakter, zawarte w niej wyniki badań mają cechy nowości naukowej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Liwii Lebelt zatytułowana „Fosfonianowe analogi kwasów amino(hydroksy)karboksylowych o potencjalnej aktywności biologicznej” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr inż. Liwii Lebelt do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionych badań, aktualność tematyki badawczej oraz potencjalną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej.

PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

dr hab. n. farm. Małgorzata Jeleń prof. SUM

Sosnowiec, dnia 06.05.2023

dr hab. n. farm. Małgorzata Jeleń, prof. SUM