

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
dr hab. n. chem. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 6 lipca 2015

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Skiby zatytułowanej

„Metalocenyłowe pochodne zasad nukleinowych oraz antybiotyków β -laktamowych – nowe biometalokoniugaty o właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych” przedstawiona Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Konrada Kowalskiego, prof. nadzw. UŁ, którego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół syntezy metalocenowych pochodnych związków organicznych o założonych właściwościach oraz poszukiwaniu ich praktycznych zastosowań.

Łączenie dwóch i więcej fragmentów farmakoforowych w nowe związki hybrydowe należy do strategii obecnie powszechnie stosowanych w poszukiwaniu związków o potencjalnie wyższej aktywności biologicznej. Opisanie przed Doktorantką koniugaty metalocenów ze sfunkcjonalizowanymi pochodnymi zasad nukleinowych doskonale wpisują się w ten wysoce aktualny, zwłaszcza w chemii medycznej, nurt badań.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Skiby została przygotowana w formie 34-stronicowego autoreferatu zawierającego wprowadzenie w podjętą tematykę, opis przeprowadzonych prac badawczych wraz z kompletem publikacji, w których opisane są wyniki. Całość uzupełnia ogólna charakterystyka dorobku naukowego Doktorantki.

Przedstawiony do oceny materiał przygotowany został w sposób przejrzysty i staranny, dobrze podkreśla osiągnięcia, a załączone publikacje dokumentują uzyskane wyniki z uwzględnieniem zaproponowanych metod syntezy, dowodów strukturalnych nowatorsko zaprojektowanych i otrzymanych związków oraz badań ich właściwości biologicznych. Oświadczenia współautorów jednoznacznie określają ich udział we wspólnych interdyscyplinarnych pracach i nie

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



pozostawiają wątpliwości, że autorami koncepcji przedstawionych badań są Promotor oraz Doktorantka i to Oni byli inicjatorami współpracy kilku zespołów.

Autoreferat rozpoczyna krótki, ale bardzo przejrzyste napisany, podrozdział dotyczący kwasów nukleinowych, co jednoznacznie wskazuje, która klasa związków jest w przeprowadzonych badaniach najważniejsza. Kolejny fragment pracy wprowadza czytelnika w chemię biometaloorganiczną, a następnie Doktorantka przedstawia stan wiedzy na temat ferrocenyowych pochodnych nukleozasad oraz metaloorganicznych antybiotyków β -laktamowych, co stanowi dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą. Wyniki przeprowadzonych prac eksperymentalnych Doktorantka opisała w podrozdziale „Badania własne”, który zawiera trzy zasadnicze części. Najpierw przedstawiła opracowane przez siebie procedury, wg których otrzymywała nowe związki chemiczne, a następnie ustaliła budowę chemiczną nowosyntetyzowanych połączeń udowadniając biegłość w interpretacji widm NMR i wykorzystaniu danych spektralnych w analizie strukturalnej. W dalszej części zbadano właściwości elektrochemiczne otrzymanych pochodnych. W ostatnim fragmencie Doktorantka zestawiała wyniki badań aktywności przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej nowych biometalokoniugatów przeprowadzonych w ramach wielośrodkowej współpracy z University of South Florida, Technische Universität Braunschweig, Narodowym Instytutem Zdrowia Publicznego w Warszawie oraz Katedrą Termobiologii w Uniwersytecie Łódzkim.

Podstawowym warunkiem realizacji założeń projektu było opracowanie dogodnej drogi syntezy zaprojektowanych związków. Autorka w sposób zasługujący na uznanie wywiązała się z tego zadania. Otrzymane zostały zróżnicowane strukturalnie cztery serie związków, koniugatów metalocenów z podstawionymi nukleozasadami, w których jako łącznik pomiędzy metaloceniem a wybraną nukleozasadą zastosowano prosty lub odpowiednio sfunkcjonalizowany łańcuch alifatyczny.

Pochodne zawierające jako łącznik ugrupowanie oksoalkilowe (oznaczone w autoreferacie jako związki **80**) zsyntetyzowano w sekwencji reakcji obejmujących acylowanie metalocenu chlorkiem 3-chloropropionylowym w warunkach reakcji Friedla-Craftsa, utworzenie akryloilowej pochodnej metalocenu w wyniku eliminacji chlorowodoru i addycję Michaela zasady nukleinowej do akryloilometalocenu. Doktorantka zauważyła, że wyodrębnianie akryloilometalocenu nie jest konieczne i tym samym efektywnie uprościła procedurę otrzymywania związków **80**.

W dalszej części pracy Doktorantka zajęła się przekształceniami otrzymanych przez siebie adduktów Michaela **80** wykorzystując reaktywność ugrupowania karbonylowego. Tym samym w sposób przemyślany zrealizowała syntezy serii analogów z łącznikiem hydroksyalkilowym (związki **84**) oraz alkilowym (związki **86**) wykorzystując odpowiednio: reakcje redukcji

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



egzocyklicznej grupy karbonylowej borowodorkiem sodowym z utworzeniem alkoholi **84** oraz redukcję za pomocą PEMB (boranu 5-etylo-2-metylopirydyny) prowadzącą do powstania alkilowych pochodnych **86**. Równolegle racemiczne pochodne hydroksylowe **84** posłużyły jako prekursorzy w syntezie pochodnych z wiązaniem podwójnym (związki **85**). W tym miejscu mam jedynie uwagę dotyczącą poprawności użytego przez Doktorantkę terminu „wysoka *regioselektywność*” w odniesieniu do redukcji grupy karbonylowej, gdyż z uwagi na obecność w rozważanych układach tylko jednej grupy karbonylowej trudno w tym miejscu mówić o regioselektywności reakcji.

Doktorantka słusznie uznała, że w zaplanowanych badaniach biologicznych wystarczające będzie użycie racemicznych alkoholi **84**. Ciekawym i ważnym z punktu widzenia przemian stereochemicznych byłoby natomiast rozpoznanie możliwości transformacji prochiralnych ketonów **80** do alkoholi **84** w obecności chiralnych odczynników redukujących (synteza enancjoselektywna). Uwaga niniejsza ma jedynie charakter ogólny, ale być może zainspiruje Doktorantkę do zajęcia się tym wątkiem badawczym w przyszłości.

Spośród wszystkich otrzymanych związków ferrocenylowych Doktorantka wskazała kilka pochodnych różnie sfunkcjonalizowanych zarówno w obrębie łącznika jak i nukleozasady, które przekazała do badań aktywności przeciwnowotworowej (badania na sześciu liniach komórkowych: MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, CCRF-CEM, SKOV-3 i L929). W tabeli 2 w rozdziale 9.1 autoreferatu Doktorantka podaje cytotoksyczność (IC_{50}) wobec trzech linii MDA-MB-231, HT-29 i MCF-7. Wprawdzie analiza danych zawartych w załączonych publikacjach pozwala wnioskować, że Doktorantka w tabeli 2 przedstawiła jedynie wybrane wyniki, ale w tym miejscu brakuje trochę krótkiej informacji wyjaśniającej tę niespójność, która na pierwszy rzut oka wyglądać może jak niekompletność danych. Szkoda, że nie jest znana toksyczność badanych związków wobec komórek prawidłowych.

Z punktu widzenia analizy zależności struktura–aktywność biologiczna (SAR), ciekawe uzupełnienie serii metalocenowych pochodnych zasad nukleinowych stanowią pochodne wielordzeniowe **88**. Doktorantka otrzymała je w reakcji Sonogashiry pochodnych 5-jodouracylu **80** z etynyloferrocenem. Porównanie uzyskanych wartości IC_{50} dla badanych związków pozwoliło doktorantce wskazać najaktywniejsze, tzw. „struktury wiodące” do dalszych modyfikacji (związki **86c** i **88a**).

Wybrane metalocenowe pochodne zasad nukleinowych Doktorantka przekazała do badań ich aktywności przeciwbakteryjnej wobec Gram-dodatnich antybiotykowrażliwych (MSSA) i antybiotkoopornych (MRSA i VRSA) szczepów gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) oraz szczepu *Staphylococcus epidermidis*. Najaktywniejszym spośród badanych okazał się

związek **80c**, pochodna 5-fluorouracylu, dla którego wartości MIC mieściły się w granicach 16-32 µg/mL.

Bibliotekę otrzymanych przez Doktorantkę związków dopełniają metalocenyłowe koniugaty antybiotyków β-laktamowych, które zaprojektowane zostały z zamysłem zbadania ich właściwości przeciwbakteryjnych, co jest w pełni uzasadnione biorąc pod uwagę obecność aktywnego komponentu β-laktamowego. Otrzymane zostały metalocenyłowe pochodne kwasu 6-aminopenicylanowego (związki **89**) oraz pochodne ampicyliny (związki **90**). W tej grupie związków najaktywniejszym, spośród badanych był koniugat rutenocenyłowy z kwasem 6-aminopenicylanowym **89c**, który wobec metycyliny-wrażliwych bakterii *Staphylococcus aureus* oraz szczepu *Staphylococcus epidermidis* (MIC odpowiednio 2 i 4 µg/mL) wykazywał aktywność 100-krotnie wyższą w porównaniu z samym kwasem 6-aminopenicylanowym (MIC odpowiednio 200 i 400 µg/mL).

Analiza materiałów uzupełniających do załączonych publikacji (Supplementary Information) dowodzi, że prace syntetyczne należy ocenić wysoko. Zawierają one komplet widm otrzymanych związków, które potwierdzają ich wysoką czystość. Świadczy to bardzo dobrze o technice pracy Doktorantki i jej doskonałym przygotowaniu warsztatowym.

Podsumowując część autoreferatową przygotowaną przez mgr Joannę Skibę należy podkreślić, że została ona napisana starannie, poprawnym językiem, a na pochwałę zasługuje staranna korekta edytorska. Z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę jedynie o drobnych błędach w nazewnictwie:

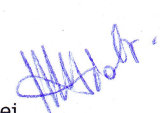
- związek **81a** to akryloiloferrocen a nie „akroiloferrocen”
- **FcCH₂Fc** to grupa ferrocenyłometyloferrocenyłowa” a nie „diferrocenyłometanowa”

Wspomniane w tym miejscu drobne niedociągnięcia w niczym nie umniejszają wartości przedstawionej rozprawy, która w opinii recenzenta zasługuje na wysoką ocenę.

Całkowity dorobek naukowy Doktorantki, w którego skład wchodzi 6 prac oryginalnych opublikowanych w pełnej wersji w latach 2012–2015 o sumarycznym IF=23.513 uważam za bardzo dobry. Prace te już zostały zauważone w literaturze, co znajduje swoje odzwierciedlenie w liczbie cytowań oraz wysokim, jak na tak młodego naukowca wskaźniku Hirscha (3). W swoim dorobku posiada również 17 komunikatów zjazdowych zaprezentowanych na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Pani mgr Skiba w czasie krótkiego okresu studiów doktoranckich odbyła również staż w zespole prof. dr hab. Bartłomieja Furmana w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie co pozytywnie wpłynęło na jej rozwój naukowy.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 35
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl



Doktorantka miała również okazję doskonalenia swoich umiejętności dydaktycznych prowadząc zajęcia ze studentami z przedmiotów chemia organiczna i chemia kosmetyczna.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanny Skiby spełnia wymagania ustawowe (Ustawa o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych). Wnoszę zatem do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę oryginalność przedstawionych badań oraz ich multidyscyplinarny charakter jak również ogólny wysoki dorobek naukowy Doktorantki zwracam się do wysokiej Rady Wydziału Chemii z wnioskiem o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Skiby.