

### Recenzja pracy doktorskiej Pni mgr inż. Moniki Domińskiej

Pani Monika Domińska ukończyła studia drugiego stopnia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w lipcu 2016 roku uzyskując tytuł magistra. W tym samym roku rozpoczęła w tej samej jednostce naukowej studia doktoranckie. Przewód doktorski został otwarty 27 lutego 2019 roku, a recenzowana praca stanowi jego zwieńczeniem.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Moniki Domińskiej pt.: „Glikokoniugacja *N*-heterocyklicznych związków biologicznie aktywnych oraz ocena ich aktywności przeciwnowotworowej” zrealizowana została w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej pod kierunkiem naukowym dr hab. inż. Gabriela Pastuch-Gawołek, prof. PŚ.

Praca ta posiada formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Stanowi go 10 prac opublikowanych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym z tzw. listy filadelfijskiej (**P.1** do **P.10**). O jakości wybranych do publikacji czasopism, w pewnym sensie, świadczyć może sumaryczny Impact Factor (IF) wynoszący 50,81 czy sumaryczna liczba punktów MEiN 1240. Do zestawu opublikowanych prac dołączony został około 50 stronicowy „przewodnik” prezentujący najważniejsze osiągnięcia naukowe znajdujące się w poszczególnych artykułach. Przygotowany on został w oparciu o szeroki zbiór publikacji świadczący o dobrej znajomości współczesnej literatury naukowej z zakresu dotyczącego tematyki badań. Całość wieńczy streszczenie w języku angielskim.

Przechodząc do oceny wartości naukowej pracy doktorskiej przedstawionej przez Panią mgr inż. Monikę Domińską należy podkreślić ogrom pracy wykonanej przez Autorkę. Dość

powiedzieć, że Doktorantka zsyntezowała oraz jednoznacznie określiła struktury 120 nowych związków, dla których przeprowadziła szereg badań określających ich aktywność biologiczną. Na każdym, kto kiedykolwiek zajmował się syntezą organiczną, a w szczególności syntezą glikokoniugatów, ta liczba musi robić ogromne wrażenie. Przy czym, co jest warte podkreślenia synteza tych związków była dobrze przemyślana i zaplanowana, tak aby służyły one realizacji postawionych sobie przez Panią Monikę celów naukowych. Zostały one jasno sformułowane już w pierwszym rozdziale pracy co, moim zdaniem, jest bardzo dobrym wyborem ponieważ czytelnik od samego początku świadomy jest postawionych celów i może na każdym etapie ocenić sposób ich realizacji. Kolejne rozdziały to: *Wprowadzenie do tematyki badawczej*, *Omówienie wyników*, *Podsumowanie i wnioski* oraz *Literatura*. Taki układ pracy jest typowy i jak najbardziej właściwy dla prac doktorskich z dziedziny chemii.

Krótki ale bardzo dobrze napisany rozdział stanowiący wprowadzenie do tematyki badawczej przygotowany został w oparciu o ponad 90 dobrze dobranych pozycji literaturowych. Glikokoniugaty, to cytując rekomendację IUPAC, rodzaj związków składających się z jednostek węglowodanowych połączonych kowalencyjnie z innymi typami składników chemicznych. Stanowią one szeroką gamę połączeń występujących naturalnie o coraz lepiej poznanej aktywności. Fragment cukrowy może pełnić w nich szereg różnych funkcji, np. w glikozylowanych białkach może wpływać na ich strukturę, decydować o rozpoznawaniu komórek czy wpływać zarówno na stabilność jak i ich degradację. Coraz częściej też łączenie fragmentów cukrowych z innymi związkami chemicznymi prowadzi się w laboratoriach. Najczęściej wprowadzenie cząsteczki cukru z wolnymi grupami hydroksylowymi zwiększa rozpuszczalność trudno rozpuszczalnych w wodzie związków, co może mieć duże znaczenie w przypadku zwiększenia aktywności biologicznej. Zbieg taki może też poprawiać dopasowanie do białek transportujących, co zwiększa zdolność przenikania przez błonę komórkową. O tym właśnie traktuje pierwsza część wprowadzania przedstawiając wpływ koniugacji cukrów na syntezę leków o zwiększonej aktywności i selektywności. W kolejnej części tego rozdziału Autorka przedstawiła stan wiedzy obecny w literaturze, a dotyczący wpływu związków *N*-heterocyklicznych na aktywność przeciwnowotworową, skupiając się szczególnie na 8-hydroksychinolinie, której sama użyła do tworzenia nowych glikokoniugatów. Związki tego typu wykazują zdolność do tworzenia kompleksów z jonami metali przejściowych. Biorąc pod uwagę



zwiększone zapotrzebowanie komórek nowotworowych na jony  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  czy  $\text{Zn}^{+2}$  pochodne takie mogą wpływać na szybkość wzrostu nowotworu i możliwości jego przerzutów. Niestety selektywność tych związków nie jest wysoka, przez co wpływają one również na rozwój zdrowych komórek. Interesująca jest więc teza, że koniugaty tych związków z cukrami mogłyby wykazywać większą selektywność wynikającą ze zwiększonego zapotrzebowania komórek nowotworowych na glukozę. Teza ta stała się jedną z najważniejszych przy projektowaniu syntez wykonanych przez Doktorantkę, a opisanych w niniejszej pracy.

W dalszej części tego rozdziału znajduje się krótka informacja o własnościach przeciwnowotworowych metotreksatu. Związek ten po odpowiednim sfunkcjonalizowaniu został wykorzystany przez Panią Monikę do połączenia z jednostką cukrową w oparciu o tzw. *click chemistry*. To właśnie związła informacja o tym podejściu syntetycznym zawarta jest w końcowej części Wprowadzenia.

Fragment zawierający omówienie wyników został podzielony na cztery części. W pierwszej znalazło się omówienie syntez oraz aktywności biologicznej pochodnych 8-hydroksychinoliny. Synteza glikokoniugatów najczęściej polega na przygotowaniu dwóch bloków, które następnie łączy się ze sobą, a następnie w razie potrzeby usuwane są grupy osłonowe. Pierwszy z bloków stanowi pochodna cukru, w której wykorzystuje się odpowiednie osłony grup hydroksylowych, a czasami również aminowych. Ponadto, jeśli łączenie odbywa się poprzez anometryczny atom węgla to w celu jego aktywacji łączy się go z łatwo odchodzącą grupą.

Doktorantka wybrała do swoich badań głównie pochodne cukrów o konfiguracji *D-gluko* i *D-galakto* (wyjątek stanowił disacharyd trehaloza). Wybór tych dwóch cukrów został uzasadniony m.in. znaczeniem ich dla metabolizmu komórek jak również faktem, że białko je transportujące (GLUT1) w przypadku komórek nowotworowych ulega nadekspresji. Pani Monika postawiła sobie za cel aby uzyskać pochodne o konfiguracji  $\beta$  anomerycznego atomu węgla, jako tej która jest preferowana przez białka transportowe. W uzyskaniu takiej konfiguracji bezsprzecznie pomogło wykorzystanie jako osłony grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-2 uczestniczącej grupy acetylowej. Jako donor glikozyłu wybrana została pochodna *O*-acetylowa, która dalej była poddana *O*-, *S*- i *N*-funkcjonalizacji. Dla istoty dalszego postępowania związanego ze strategią *click chemistry* aglikony zawierały ugrupowanie azydkowe bądź alkinowe. W ten sposób autorka otrzymała zestaw

ponad 50 pochodnych odpowiednio zmodyfikowanych przy anomerycznym atomie węgla. Kolejnych osiem uzyskała wykorzystując odpowiednie pochodne zawierające podstawniki o określonych wcześniej cechach przy terminalnym atomie węgla C-6. Były to m.in. dwie pochodne kwasu D-glukuronowego i dwie trehalozy. Wśród uzyskanych pochodnych były związki zarówno z osłonami O-acetylowymi jak i produkty ich deacetylowania. Ten zabieg miał na celu próbę odpowiedzi na pytanie czy obecność osłon, zwiększających lipofilowość związków, wspiera bierny mechanizm ich przenikania przez błonę komórkową.

Drugi blok budulcowy stanowiły pochodne 8-hydroksychinoliny i 8-hydroksychinaldyny. W ich przypadku sfunkcjonalizowana została grupa hydroksylowa w taki sposób aby wprowadzić na nią podstawnik z ugrupowaniem azydkowym lub alkinowym.

Dysponując odpowiednimi blokami pochodnych Doktorantka przystąpiła do ich łączenia uzyskując szereg glikokoniugatów. Pierwsze osiem stanowiły glikozydy uzyskane przy wykorzystaniu czterech różnych procedur syntetycznych opisanych w literaturze. Ich pełna charakterystyka została opublikowana w artykule znajdującym się w załączonym cyklu pod nazwą **P.1**. Pozostałe glikokoniugaty od **G9** do **G119** otrzymane zostały na drodze katalizowanej jonami miedzi(I) reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddykcji azydo-alkinowej. Ta grupa związków została opisana w publikacjach **P.1**, **P.2**, **P.3** i **P.4**. Przykładowe widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR zostały przedstawione w pracy, a opis wydajności poszczególnych syntez został zawarty w Tabeli 1. Została ona opracowana starannie i w bardzo logicznej formie, co znakomicie ułatwia poruszanie się w gąszczu tych danych. Mając na uwadze wygodę i szanując czas czytelnika w tabeli przedstawiono, obok numeracji użytej w niniejszej pracy, również numerację oryginalną związków z publikacji wraz z numerem artykułu, w którym znalazł się ich pełny opis. Na podkreślenie zasługuje to, że wszystkie syntezy przebiegały z dobrymi lub bardzo dobrymi wydajnościami.

Dla tak otrzymanej grupy glikokoniugatów **G1-G119** przeprowadzone zostały badania aktywności biologicznej. Do badań wybrane zostały głównie dwa typy testów. Pierwszym był test cytotoksyczności MTT. Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoksycznego i zalecany jako referencyjny przez międzynarodowe organizacje normotwórcze. Jego krótki opis Autorka umieściła w pracy, co jest dużym ułatwieniem dla czytelników mniej biegłych w tej tematyce. Drugim był test hamowania aktywności  $\beta$ 1,4-GalT. Badania zdolności



cytotoksyczności wykazały, że większą aktywnością charakteryzowały się związki z zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi. Wyniki uzyskane dla pochodnych z wolnymi grupami hydroksylowymi w jednostce cukrowej wskazują, że wymiana atomu tlenu na atom siarki nie zwiększa powinowactwa tych związków do białek transportujących GLUT, a także nie poprawiała ich selektywności. Również wprowadzenie do aglikonu dodatkowego pierścienia heterocyklicznego, mające na celu zwiększenie zdolności do kompleksowania jonów metali, nie przyniosło spodziewanego efektu.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki aktywności biologicznej trzech omówionych grup utwierdziły ją w opinii, że glikokoniugaty z fragmentami nie cukrowymi przyłączonymi w pozycji anomerycznej preferują bierny mechanizm transportu przez błonę komórkową i nie wykazują powinowactwa do transporterów GLUT. Dlatego kolejną grupę (**G111-G119**, opisane w **P.4**) stanowiły związki cukrowe posiadające modyfikację terminalnej grupy hydroksylowej przy atomie węgla C-6. W tej grupie najwyższą aktywnością wykazały się dwie pochodne D-glukopiranozy (z wolnymi i zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi), w których część chinolinowa została przyłączona poprzez atom azotu 1,2,3-triazolu bezpośrednio do atomu węgla C-6. Wykazywały one zbliżoną cytotoksyczność, jednak prawdopodobnie ze względu na wyższe powinowactwo do GLUT pochodna z wolnymi grupami hydroksylowymi wykazywała wyższą selektywność. Ponadto wykorzystanie trehalozy do syntezy tego typu glikokoniugatów nie przyniosło spodziewanego efektu.

W dalszej części Doktorantka opisała syntezę potencjalnych metabolitów zsyntezowanych przez siebie glikokoniugatów. Liczyła na to, że ich badania wskażą na to które są kluczowe w aktywności przeciwnowotworowej. Wyniki pokazały, że nie wykazywały one spodziewanej zdolności do hamowania proliferacji badanych komórek, co Autorka tłumaczy brakiem możliwości ich transportu przez błonę komórkową. Wyniki te zostały umieszczone w publikacji **P.5**.

Cykl publikacji od **P.5**, **P.6** i **P.7** zawiera opis prac związanych z badaniami na możliwości wykorzystania nanoosników polimerowych do ukierunkowanego transportu wcześniej opisanych glikokoniugatów. Do badań wybrano polimery micelarne wykazujące zdolność do zrzucania otoczki PEG lub pęcznienia w środowisku kwaśnym. Za pomocą testu cytotoksyczności MTT porównana została aktywność wobec wybranych linii komórkowych wolnych leków, wolnych miceli i miceli obciążonych lekiem. Uzyskane wyniki wydają się być bardzo interesujące. Wykazały

one, że enkapsulacja glikokoniugatów z zabezpieczonymi grupami hydroksylowymi w nośnikach wrażliwych na pH znacznie zwiększyła ich skuteczność, co pozwala na znaczne zmniejszenie dawek terapeutycznych.

Ostatnie trzy zawarte w opisywanym cyklu publikacji pozycje **P.8**, **P.9** i **P.10** stanowią opis prac nad glikokoniugacją pochodnej metotreksatu (MTX), będącego antagonistą kwasu foliowego i wykorzystywanego jako lek cytostatyczny. W pierwszym etapie grupy aminowe metotreksatu Pani Monika sfunkcjonalizowała za pomocą chloromrówczanu propagilu. Następnie tak otrzymaną pochodną połączyła z  $\beta$ -D-glukopiranozydem 2-azydoetylu. Uzyskany glikokoniugat poddany został badaniom cytotoksyczności MTT na szeregu różnych nowotworowych linii komórkowych. Jak podkreśla Autorka, wyniki należy traktować jako wstępne, jednak mogą one stanowić obiecujący wstęp do dalszych badań. Otrzymana pochodna MTX charakteryzowała się zbliżoną aktywnością do niezmienionego leku, jednak w porównaniu z nim wykazywała większą selektywność, co jak sugeruje Doktorantka, może być wynikiem ułatwionego transportu pochodnej przez białka transportowe GLUT, a następnie uwolnieniu cząsteczki aktywnej wewnątrz komórki.

Podsumowując, opisany cykl publikacji zawiera bardzo bogaty i interesujących materiał. Wyniki syntez wskazują na dobrze opanowany warsztat syntetyczny Doktorantki, a przedstawiona charakterystyka uzyskanych związków nie budzi wątpliwości co do ich struktury. Wybór zsyntezowanych związków wskazuje na logiczny ich dobór, który pozwolił przeprowadzić szerokie badania ich aktywności biologicznej, których to wyniki umożliwiły wyciągnięciu szeregu ważnych i interesujących wniosków. Stanowią one cenny i nowatorski wkład w badania nad możliwością wykorzystania glikokoniugatów w terapii przeciwnowotworowej. Praca napisana jest dobrą polszczyzną, co sprawia że czyta się ją bardzo dobrze. Znikoma ilość błędów edytorskich wskazuje na bardzo staranną korektę. Z obowiązku recenzenta chciałbym wskazać na te drobne niedociągnięcia, które udało mi się wychwycić:

- w tytule podrozdziału 3.1.1. określenie pochodne cukrowe D-glukozy i D-galaktozy moim zdaniem niepotrzebnie zawiera określenie „cukrowe” ponieważ wszystkie pochodne tych monoz są pochodnymi cukrów;

- pkt. 3 strona 8 HRMS nie jest metodą spektroskopową;

- str. 11 „disiarczkowego” zastąpiłbym raczej słowem „disulfidowego”;



- str. 16 we współczesnej nomenklaturze 1-aminocukry to glikozyloaminy;
- str. 29 dwukrotnie powtórzone słowo „przerób” nie wydaje się być najszcześniejsze;
- str. 42 „przypisać dla glikokoniugatów” to germanizm i raczej należałoby napisać „przypisać glikokoniugatam”;
- str. 51 myślę, że pisząc „rozkład w komórce” Autorka miała raczej na myśli procesy dysocjacyjne.

Jak widać ich liczba i charakter absolutnie nie wpływa na bardzo wysoką wartość merytoryczną pracy.

Biorąc więc pod uwagę wysoką wartość naukową przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr inż. Moniki Domińskiej mogę w pełni stwierdzić, że spełnia ona wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim i Kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora i z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Domińskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie uwzględniając wysoki poziom merytoryczny recenzowanej dysertacji oraz ponadprzeciętny dorobek naukowy Kandydatki chciałbym zgłosić wniosek, jeśli to możliwe, o wyróżnienie tej pracy.

