

Prof. dr hab. Jarosław Polański  
Centrum Projektowania i Syntezy Leków i Materiałów  
Instytut Chemii Uniwersytetu Śląskiego  
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

Katowice, 30 lipca 2024

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister inż. Karoliny Juszcak pt.  
„Synteza pochodnych aldehydów hydroksybenzoesowych o  
potencjalnych właściwościach inhibitorów ludzkiej heksokinazy 2  
(HK2)”**

Przedstawione w recenzowanej pracy wyniki nawiązują do tematyki badań promotora rozprawy prof. Krzysztofa Walczaka, który zajmuje się między innymi problemami syntezy chemicznej, w szczególności związków o aktywności przeciwnowotworowej.

Synteza chemiczna zajmując się konstruowaniem cząsteczek, podstawowego obiektu badań chemicznych, definiuje kluczowe problemy chemii. Mimo postępów chemii organicznej synteza wciąż przysparza wielu trudności a chemicy wierzą, że wciąż pozostaje ona sztuką. Szczególnie w ostatnich latach wiele uwagi poświęca się poszukiwaniem nowych metod spełniających wymogi zielonej chemii. Optymalizacja syntezy w kontekście ekonomii atomowej, katalizy, toksyczności środowiska reakcji, wyższej efektywności energetycznej czy recyklingu to nowe cele współczesnych prac syntetycznych. Mimo rozwoju metod obliczeniowych, np. retrosyntezy (porównaj np. Retrosynthesis from transforms to predictive sustainable chemistry and nanotechnology: a brief tutorial review, Green Chemistry 25 (8), 2971-2991, 2023) eksperymentalna weryfikacja preparatyki związków organicznych pozostaje wciąż koniecznym elementem ich syntezy.

Celem pracy było „opracowanie efektywnych metod syntezy pochodnych wybranych hydrazonów i N-acylowanych hydrazyn aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoesowych, w których fragment N-acylowy stanowiły kwasy aromatyczne o różnych „obszarach molekularnych”: benzen, naftalen, antracen pochodne kwasu benzoowego, kwas propionowy oraz aminokwasy endogenne. Doktorantka słusznie zauważa że optymalizowane reakcje są wieloetapowymi syntezami wymagającymi indywidualnych strategii ze względu na różne właściwości chemiczne stosowanych substratów (duża zmienność ich struktur chemicznych). W domenie chemii farmaceutycznej cel pracy sformułować można jako badanie wpływu w/w

fragmentów molekularnych wybranych inhibitorów heksokinazy 2 na ich aktywność biologiczną.

Konstrukcja rozprawy jest typowa dla pracy doktorskiej. Składa się z trzech części: literaturowej, omówienia wyników oraz części eksperymentalnej. Część literaturową poprzedza, abstrakt oraz wprowadzenie. Pracę kończy zaś podsumowanie, bibliografia, załączniki (widma NMR i MS) oraz wykaz dorobku Doktorantki. Praca liczy 163 strony. Autorka cytuje 173 pozycje literaturowe.

W przeglądzie literaturowym pani Juszcak opisała własności oraz problemy syntetyczne zasad Shiffa oraz pochodnych hydrazyny. Typowo syntetycznymi problemami omawianymi w tej części to redukcja wiązania iminowego oraz zabezpieczanie grupy aminowej. Ponieważ ważnym aspektem pracy jest aktywność biologiczna syntezowanych związków, Doktorantka omawia także tzw. efekt Warburga oraz cel działania projektowanych związków, którym jest heksokinaza 2 oraz znane inhibitory tego enzymu. Rozdział 2.10.3 (str. 36) *Określanie struktur wiodących inhibitorów HK2* formułuje w zasadzie hipotezę pracy, którą wyrazić można jako: projektowane pochodne benserazydu oraz benitrobenzazydu są obiecującymi inhibitorami HK2. Dalej formułuje ogólny cel pracy, którym jest transformacja strukturalna tytułowych związków w celu *optymalizowania struktury wiodącej*. W rozdziale 3.1 (str. 37) uzasadnia bliżej taki cel pracy, omawiając HK2 jako cel terapeutyczny w nowotworach, znane inhibitory HK2 oraz problemy aplikacji znanych inhibitorów np. lonidamidu. Szczegółowym celem pracy jest projektowanie i synteza N-acylowych pochodnych hydrazonów aldehydów mono- oraz polihydroksybenzoesowych, których atom azotu N-2 jest acylowany kwasami benzoesowymi, kwasem propionowym lub aminokwasami oraz badania ich aktywności przeciwnowotworowej w interakcjach z (HK2). Już takie zdefiniowanie celu pozwala zorientować się w charakterze pracy, w której centralne znaczenie mają problemy syntetyczne. Cele syntetyczne wyznaczono arbitralnie, a problemy projektowania leków w takim ujęciu pozostają na dalszym planie. Z punktu widzenia projektowania molekularnego Autorka testuje zmiany położenia grup hydroksylowych we fragmencie aromatycznym oraz zastąpienie grupy nitrowej innymi funkcjami. Jest to, jak najbardziej prawidłowe, jedno z typowych podejść klasycznej farmacji. Wszystkie elementy badań własnych zostały przez Doktorantkę zaplanowane dobrze.

Na stronach 38-81 Autorka omawia problemy syntezy projektowanych związków. Żeby pokazać jak ważne to problemy i jak trudno optymalizować syntezę warto przytoczyć przykład prób otrzymania jednego z hydrazonów (Tabela 5, str. 61). Wydajności wahają się od „śladów” do 55% (czysty produkt). Chemia decyduje, że konieczna są takie żmudne optymalizacje wielu z opisywanych przez Autorkę reakcji. Na stronach 124-125 Doktorantka szczegółowo podsumowuje uwarunkowania syntezy badanych związków. W szczególności selektywność ich

syntezy, zmienność reaktywności jako funkcję struktury, ewentualną konieczność wprowadzania grup zabezpieczających jako funkcji struktury. Podaje także konkretne warunki i reagenty skuteczne dla konkretnych przykładów struktury.

Kolejnym celem pracy był pomiar aktywności biologicznej uzyskanych połączeń. Warto podkreślić, że Doktorantka samodzielnie przeprowadza opisywane badania. Najwyższą aktywność hamowania HK2 wyjażywał (E)-4-fluoro-N'-(2,3,4-trihydroksybenzylideno)benzohydrazyd. Strukturalne wymogi aktywności to obecność fragmentu 2,3,4-trihydroksybenzoowego, funkcji iminowej oraz podstawnika aromatycznego.

Chociaż generalnie wnioski dobrze podsumowują wykonane przez Doktorantkę badania, pewien niedosyt budzić może ich precyzja. Na przykład Doktorantka pisze: *Spośród wszystkich otrzymanych (...) część pochodnych wykazywała wyższą aktywność (...)*. Znacznie precyzyjniej i prościej można to wyrazić. Otrzymałam (ile) pochodnych, z których (ile było aktywniejszych niż (...)). Polecam lekturę książki Stevena Pinkera, Piękny styl. Prosty i precyzyjny styl decyduje w dużej mierze o odbiorze treści.

Konkludując, przedstawiłem powyżej bardzo skrótowo treści recenzowanej pracy. Zakres przeprowadzonych eksperymentów budzić musi duże uznanie. Tym bardziej, że optymalizacja, czy korygowanie syntez opisanych w literaturze stanowią żmudny i często niewdzięczny temat badań. Doktorantka musiała biegle opanować nie tylko sztukę pracy laboratoryjnej w dziedzinie syntezy organicznej. Z praktyki syntetycznej doskonale wiem, że pokonanie tego niewdzięcznego etapu często warunkuje postęp dalszych prac. Autorka testuje wiele różnych układów syntetycznych. Praca wymagała także zastosowania i interpretacji spektroskopowych metod identyfikacji związków organicznych oraz znajomości podstaw chemii medycznej *in vitro*.

Tematyka badań związana jest z bardzo aktualnymi zagadnieniami chemii syntetycznej oraz chemii medycznej w szczególności terapii p-nowotworowej. W zakresie chemii medycznej jest przykładem klasycznych badań, w których pierwszoplanowym celem są problemy syntetyczne. Mniejsze znaczenie odgrywa aspekt projektowania leków. W tym kontekście nasuwa mi się kilka pytań, na które spodziewałbym się uzyskać od Autorki odpowiedzi w czasie obrony. Jeżeli aspekt syntetyczny jest pierwszoplanowym, to w jak Autorka ocenia zastosowanie metod retrosyntezy do planowania syntez. Być może zastosowanie metod retrosyntetycznych umożliwiłoby znajdowanie warunków reakcji korzystnych dla stosowania w planowanych reakcjach, w tym także konkretnych rozpuszczalników, reagentów oraz identyfikację nowych typów syntez. W ostatnich latach postęp w zakresie oprogramowania jest w tym zakresie imponujący. Jednym z programów retrosyntezy dostępnych w tym zakresie jest baza Reaxys.

Ciekaw jestem, czy licencja Politechniki Śląskiej ma opcję retrosyntezy, a jeżeli tak, to jaką (są różne, jakie?). Metoda retrosyntezy jest szczególnie ciekawa w kontekście udziału polskich chemików w jej tworzeniu. Następne pytanie jakie mi się nasuwa to jak Autorka widzi potencjał farmaceutyczny wykonanych badań. Czy badania inspirowane były *zewnętrznym* zainteresowaniem w tym zakresie. Autorka w dyskusji wpływu struktury otrzymanych związków na hamowanie HK2 odnosi się do symulacji oddziaływań inhibitorów z HK2. Czy otrzymane związki pozwalają na przykład na zaprojektowanie następnej generacji związków o potencjalnie wyższej aktywności. Pewną wskazówkę daje Autorka w tym względzie na str. 126, pisząc (...) można wnioskować, że podczas projektowania (...) należy uwzględnić kluczowe cechy strukturalne, takie jak obecność układu 2,3,4-trihydroksy benzoowego i ugrupowania iminowego oraz podstawnik aromatyczny z podstawieniem w pozycji para dla N-acylowej pochodnej hydrazonu 2,3,4-trihydroksykowego. Odpowiedzi na te pytania spodziewam się przedyskutować z Doktorantką w czasie obrony.

Pod względem edytorskim praca ma bardzo staranną formę. Gorzej wygląda strona językowa. Potknięć jest wiele. Choćby takie sformułowania jak (i) *„Ze względu na nieodpowiedni tryb życia człowieka charakteryzujący się brakiem ruchu oraz nieodpowiednią dietą (...) prognozuje się, że częstotliwość zachorowań na nowotwory nadal będzie wysoka* (str. 11). Trudno zarzucać nam nieodpowiedni tryb życia. Znacznie zgrabniej myśl Autorki wyrazić można na przykład: *Brak ruchu oraz niezdrowa dieta człowieka (...) przyczynia się do (...)*. (ii) *wszechstronność wiązania iminowego ?* (str. 17) czy wiązanie może być wszechstronne; (iii) *zgłaszanych(?) inhibitorów HK2 nie wywołuje znaczącego efektu terapeutycznego* (str. 37); rozumiem jako ujawnianych w patentach (?) (iv) *Jednakże katalityczne uwodornienie (...) oraz istnieje potrzeba zapewnienia wysokociśnieniowych reakcji, które stwarzają zagrożenie dla bezpieczeństwa* (str. 71); (v) *została podjęta autorytarnie (?)* zamiast arbitralnie. W tekście brakuje odniesienia do rysunku 42, co utrudnia jego zrozumienie. Takich potknięć jest wiele. Przeważne jednak nie utrudniają one odczytania znaczeń zdań. Błędy te nie umniejszą znaczenia pracy. Widać jednak małe doświadczenie w redakcji tekstów naukowych.

Dorobek Doktorantki obejmuje dwie publikacje w *Molecules* oraz *IJMS* (obie 140 pkt), w których jest pierwszą autorką. Warto zauważyć, że ta druga ma już 8 cytowań (GS). Ilustruje to jak bardzo potrzebne są dane uzyskane w badaniach pani Juszcak. Dorobek Doktorantki uzupełnia 5 wystąpień konferencyjnych.

Podsumowując, wyniki uzyskane w zrealizowanej rozprawie doktorskiej stanowią istotny wkład w rozwój metod syntezy pochodnych aldehydów hydroksybenzoowych o potencjalnej aktywności względem HK2. Po analizie przedstawionych treści rozprawy potwierdzam ścisły związek pomiędzy przedstawionym celem pracy, a wnioskami końcowymi. Stwierdzam, że

rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Juszcak spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Juszcak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jarosław Polański