Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska,
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec
bmlodawska@sum.edu.pl
tel. 32 364 16 04

Sosnowiec, 08.07.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Juszczak:

„Synteza pochodnych aldehydów hydroksybenzoesowych o potencjalnych właściwościach inhibitorów ludzkiej heksokinazy 2 (HK2)".

przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Juszczak została przygotowana w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii, Wydziału Chemicznego, Politechniki Śląskiej w Gliwicach, pod opieką promotorską Pana prof. dr hab. n. chem. inż. Krzysztofa Walczaka.

Dysertacja została przygotowana w sposób tradycyjny, w postaci 173-stronicowej rozprawy doktorskiej zawierającej: *Streszczenie w języku polskim, Abstrakt anglojęzyczny, Rozdziały: Wprowadzenie i cel pracy, Część literaturową, Część badawczą z podrozdziałem uzasadniającym realizowane badania zarówno chemiczne jak i biologiczne, Część eksperymentalną, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografię, Załączniki oraz Wykaz dorobku naukowego związanego z doktoratem.* Praca zawiera także wykaz skrótów. Na pierwszych stronach Doktorantka złożyła podziękowanie Panu Promotorowi i zespołowi zaangażowanemu w realizację doktoratu, co ukazuje dojrzałość Doktorantki i pełną świadomość złożonej pracy w zespole badawczym. W rozprawie znajduje się wykaz osiągnięć Doktorantki w skład którego wchodzi:

- ✓ współautorstwo 2 publikacji (z lat 2022-2024) o zasięgu międzynarodowym, zaprezentowanych w czasopismach o sumarycznym wskaźniku oddziaływania IF = 10,2 i punktacji ministerialnej 280:
  a. *K. Juszczak, W. Szczepankiewicz, K. Walczak. „Synthesis and Primary Activity Assay of Novel Benitrobenrazide and Benserazide Derivatives", Molecules. 2024, 29, 629.*
  b. *K. Juszczak, A. Kubicka, R. Kitel, G. Dzido, M. Łabieniec-Watała, S. Zawadzki, A. Marczak, K. Walczak, K. Matczak, M. D. Tomczyk. „Hexokinase 2 Inhibition and Biological Effects of BNBZ and Its Derivatives: The Influence of the Number and Arrangement of Hydroxyl Groups", International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 2616.*
- ✓ współautorstwo pięciu prezentacji na konferencjach naukowych.

Powyższy dorobek naukowy oceniam wysoko, a publikacje, w których Doktorantka jest pierwszym współautorem zostały zapewne już odnotowane w literaturze, co jest wysokim osiągnięciem jak na młodego badacza.

Dysertacja rozpoczyna się jasno przygotowanymi rozdziałami: Wprowadzenie i Część literaturowa, do przygotowania, których wykorzystano 112 pozycji literaturowych na wszystkie 173 cytowane w rozprawie. Materiał ten powstał w większości w oparciu o literaturę ostatnich piętnastu lat, równocześnie wskazując, iż tematyka poruszona w rozprawie jest bardzo aktualny. Autorka przedstawiła doniesienia naukowe omawiające charakterystykę i właściwości zasad Schiffa, problemy związane z redukcją wiązania iminowego jak i grupy zabezpieczające stosowane w strategiach chemicznych transformacji. W dalszej kolejności Doktorantka podjęła tematykę metabolizmu komórek nowotworowych ukazując heksokinazę 2 (HK2) wykazującą nadekspresję w komórkach nowotworowych jako cel molekularny w terapii przeciwnowotworowej. Zostały zaprezentowane potencjalne inhibitory tego enzymu opisane w literaturze, ze szczególnym zwróceniem uwagi na najnowsze doniesienia FDA dotyczące benserazydu (Benz) (leku dotychczas stosowanego w leczeniu parkinsonizmu) a następnie benitrobenrazydu (BNBZ) jako swoistych nowych struktur wiodących w tym obszarze z udowodnioną aktywnością przeciwnowotworową zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Można uznać, iż materiał ten jest wprowadzeniem jak i zapowiedzią obszarów tematycznych realizowanych w późniejszych częściach rozprawy.

Doktorantka mając na uwadze doniesienia literaturowe podjęła badania w obszarze projektowania nowych molekuł zbudowanych na strukturalnej bazie Benz i BNBZ mogących być efektywnymi jak i selektywnymi inhibitorami HK2, tym samym wpisując się w nurt naukowy poszukiwania związków chemicznych pozwalających walczyć z chorobą cywilizacyjną jaką jest choroba nowotworowa.

Wyniki przeprowadzonych prac badawczych Pani mgr Karolina Juszczak podzieliła na dwie części: chemiczną i biologiczną. Wyniki badań chemicznych zostały zawarte w rozdziale opisującym eksperymenty 4.3 a ich omówienie Doktorantka opisała w rozdziałach 3.2-3.6. Część biologiczna jest zawarta w rozdziale 4.4 natomiast omówiona w rozdziale 3.7.

Badania obejmujące część chemiczną zostały przygotowane w oparciu o studia literaturowe, które pozwoliły Doktorantce zaprojektować a następnie zbudować bibliotekę związków chemicznych będących pochodnymi hydrazonów i hydrazydów aldehydów mono jak i polihydroksybenzoesowych. Zadanie to wiązało się z opracowaniem nowych wieloetapowych syntez, sposobów wydzielania finalnych związków i charakterystyką spektralną udawadniającą ich budowę. Bazując na strukturach wiodących Pani Mgr dokonywała zmian ilości i położenia grup hydroksylowych w układzie aromatycznym, zastępowała grupę nitrową innymi grupami funkcyjnymi, zamieniała serynę pierwotnie występującą w benserazydzie na inne aminokwasy endogenne, wprowadzała różne objętościowo podstawniki aromatyczne do układu N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu oraz rozwiązywała problemy redukcji wiązania iminowego w wybranych pochodnych N-acylowych hydrazonów. Procedury te doprowadziły do otrzymania gamy pochodnych, które w dalszym etapie posłużyły do przeprowadzenia analizy zależności struktura-aktywność. Autorka w swych badaniach opracowała liczne przepisy, wg których otrzymywała nowe związki chemiczne. Bardzo wysoko doceniam ogrom pracy zrealizowany w laboratorium chemii organicznej jak i umiejętność dokonywania trudnych analiz spektroskopii ^{1}H jak i ^{13}C NMR. Pragnę zwrócić uwagę, że warsztat chemiczny został zaprojektowany profesjonalnie i wnikliwie z dużą wiedzą związaną z mechanizmami przebiegających reakcji. Wyniki badań zostały opisane rzetelnie bez pominięcia gorszych rezultatów czy sytuacji wymagających poszukiwań lepszych rozwiązań wydzielania finalnych produktów. W syntezach wykorzystano nowoczesne narzędzia jak reaktor mikrofalowy czy reaktor ciśnieniowy. Rzetelnie ukazano problemy syntetyczne związane z otrzymaniem np. czystego hydrazonu 7h i próby optymalizacji drogi syntezy, czy też problemy z wydzielaniem tylko śladowych ilości produktów co jako recenzent bardzo

doceniam. Warto zwrócić uwagę, iż w pracy doktorskiej zostały ukazane syntezy ponad sześćdziesięciu związków w tym prawie połowa z nich to nowe substancje chemiczne wcześniej nieopisanych w literaturze. Struktura tych pochodnych została udokumentowana widmami spektroskopii NMR i spektrometrii mas HRMS, które w rozprawie zostały ujęte na stronach od 138 do 162. W tym miejscu zrodziła się moja uwaga dotycząca braku numeracji związków w części eksperymentalnej i załączniku, jak i pytanie dlaczego Doktorantka w załączniku umieściła tylko 10 widm HRMS nowych związków?

Drugą częścią badań, które zostały przestawione w dysertacji są badania biologiczne wykonane w kooperacji z Wydziałem Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi. Zostały wykonane testy cytotoksyczność MTT w stosunku do dwóch linii komórek nowotworowych wątroby HepG2 i Huh7, w których wyznaczono wartości IC_{50} dla badanych związków, test klonogenności ukazujący wpływ związków na zdolność tworzenia kolonii, testy aktywności w stosunku do heksokinazy z użyciem czystego enzymu jak i na liniach komórek nowotworowych. Oceniono również aktywność w stosunku do HK2 metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej odwróconych faz (RP-HPLC). Dodatkowo zostały wykonane badania termoforezy mikroskalowej w kooperacji z Wydziałem Chemii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Uzyskane wyniki pokazały zróżnicowane aktywności przeciwnowotworowe związków i pozwoliły na przeprowadzenie wnikliwych analiz zależności struktura aktywność. Na uwagę zasługuje fakt, iż w grupie nowych związków otrzymanych przez Doktorantkę znalazły się pochodne wykazujące wyższą aktywność inhibicyjną niż struktury wiodące.

Analizując wyniki badań biologicznych chciałabym zapytać czy Doktorantka uczestniczyła w ich realizacji oraz chciałabym zapytać czy znana jest cytotoksyczność badanych związków w stosunku do prawidłowych linii komórkowych. Dodatkowo chciałabym zapytać o inne cele molekularne w stosunku do których badane związki mogłyby wykazywać aktywność.

Oceniając dysertację recenzent upoważniony jest do zwrócenia uwagi na pewne uchybienia formalne. Uwagi te dotyczą następujących zagadnień:

- ✓ brak spisu rycin, schematów i tabel,
- ✓ brak numeracji związków w części eksperymentalnej i w załączniku,
- ✓ drobne błędy literowe na str.104 zapis chlorku magnezu powinien wyglądać jako $MgCl_2$; powinien być również indeks dolny w zapisie F_{254}; na stronach 121,122 i 123

skrót magister powinien być pisany małą literą; na str. 125 pierwiastek pallad powinien być napisany małą literą, na str.38 błąd literowy w zapisie „..*w benserezydzie*" a powinno być w benserazydzie,

- ✓ w rozprawie powinny być stosowane zapisy ułamków dziesiętnych zgodne z językiem polskim czyli stosujące przecinek, a nie kropkę tak jak to ma miejsce w języku angielskim.
- ✓ w zapisach widm NMR powinien zostać wskazany rozpuszczalnik deuterowany $DMSO_{d6}$, powinna zostać podana właściwa częstotliwość przy analizie widm ^{13}C NMR (jest 600 MHz a powinno być 150 MHz) oraz zapis stałej sprzężenia powinien zostać napisany kursywą z podaniem jednostki częstotliwości.

Przedstawione uwagi nie zmniejszają walorów poznawczych rozprawy doktorskiej, a służą skorygowaniu niedociągnięć w przyszłościowym przygotowaniu materiału publikacyjnego.

Oceniając rozprawę doktorską napisaną przez Panią mgr Karolinę Juszczak pragnę podkreślić, że została ona przygotowana w sposób bardzo przejrzysty i rzetelny. Można śmiało stwierdzić, iż uzyskane wyniki są w pełni nowatorskie i obiecujące. Jestem przekonana, iż zebrany w dysertacji materiał stanie się tematem publikacji naukowych w poczytnych czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Podsumowanie

Jednoznacznie stwierdzam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Juszczak, spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 187 ust. 1 i 2, ustawy o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych a tym samym znacząco przyczynia się do rozwoju dyscypliny nauk chemicznych. Wnoszę do Wysokiej Rady Nauki Chemiczne, Politechniki Śląskiej w Gliwicach o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nowatorskie wyniki i charakter aplikacyjny rozprawy oraz znaczący dorobek naukowy Doktorantki wnoszę wniosek o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej.

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Podpisano odręcznie przez autora
prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska

Sosnowiec, dnia 8 lipiec 2024 prof. dr hab. n. farm. Beata Morak-Młodawska