

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Sowy-Kasprzak
pt. „Synteza i charakterystyka hybrydowych połączeń kurkuminy,
pochodnych kwasu oleanolowego oraz wybranych leków przeciwzapalnych”**

wykonana na wniosek Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej, pod opieką merytoryczną promotora prof. dr. hab. Lucjusza Zaprutko oraz promotor pomocniczej dr hab. Anny Pawełczyk. Praca ta została zrealizowana w ramach projektu badawczego pt.: „Modulowanie struktury i właściwości kurkuminy z wykorzystaniem triterpenowych modyfikatorów oleanolowych” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, konkurs Preludium 14, Umowa nr UMO-2017/27/N/NZ7/02423. Jej podstawą jest cykl trzech artykułów, spójnych tematycznie, o łącznym współczynniku oddziaływania IF 10.5, co stanowi 380 punktów ministerialnych:

1. Katarzyna Sowa-Kasprzak, Dorota Olender, Jacek Kujawski, Lucjusz Zaprutko, Anna Pawełczyk. Synthesis of curcumin derivatives containing non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **2023**, 80(2), 289-304.
2. Katarzyna Sowa-Kasprzak, Ewa Totoń, Jacek Kujawski, Dorota Olender, Natalia Lisiak, Lucjusz Zaprutko, Błażej Rubiś, Mariusz Kaczmarek, Anna Pawełczyk. Synthesis, cytotoxicity and molecular docking of new hybrid compounds by combination of curcumin with oleanolic acid. *Biomedicines* **2023**, 11, 1506.
3. Katarzyna Sowa-Kasprzak, Małgorzata Józkowiak, Dorota Olender, Anna Pawełczyk, Hanna Piotrowska-Kempisty, Lucjusz Zaprutko. Curcumin-triterpene type hybrid as effective sonosensitizers for sonodynamic therapy in oral squamous cell carcinoma. *Pharmaceutics* **2023**, 15, 2008.

Prace są wieloautorskie. Doktorantka przedstawiła oświadczenia współautorów prac o ich roli oraz wkładzie merytorycznym. We wszystkich publikacjach mgr Katarzyna Sowa-Kasprzak jest autorem korespondującym, zaś z oświadczeń można wywnioskować, iż jej rola była wiodąca w zakresie przedstawianych problemów. Rozprawa oprócz kopii ww. publikacji oraz oświadczeń współautorów, zawiera czterdziestotrzystronicowy komentarz obejmujący syntetyczną charakterystykę dotychczasowej aktywności naukowej doktorantki, prezentację przedmiotu badań wraz z odniesieniami literaturowymi oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Nim przejdę do właściwej recenzji, już w tym momencie pozwolę sobie na konkluzję o tym, iż z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia kryteria właściwe dla rozpraw doktorskich, co uzasadnia postawienie wniosku o przyjęcie rozprawy doktorskiej i kontynuowanie dalszych czynności w ramach przewodu doktorskiego pani mgr Katarzyny Sowy-Kasprzak. Zakres podjętych w ramach rozprawy prac badawczych jest szeroki, poczynając od pracochłonnych eksperymentów syntetycznych, poprzez badania spektroskopowe potwierdzające strukturę otrzymanych cząsteczek, badania biologiczne, a na próbach wyprowadzenia jakościowych zależności pomiędzy strukturą molekularną a bioaktywnością oraz wytypowania *in silico* potencjalnych tarcz docelowych kończąc. Podjęta tematyka badawcza zawiera istotny potencjał zarówno poznawczy, jak i użyteczny. Doktorantka otrzymała szereg nowych połączeń kurkuminy i jej analogów strukturalnych z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi oraz z pochodnymi kwasu oleanolowego, opracowując jednocześnie wydajne i selektywne procedury syntetyczne. Uzyskane wyniki badań biologicznych mogą z kolei przyczynić się do racjonalnego projektowania dalszych modyfikacji strukturalnych, otwierając drogę do nowych hybrydowych cząsteczek terapeutycznych opartych o motyw kurkuminy. Umiejętności, jakimi wykazała się doktorantka pozwalają stwierdzić, że jest ona przygotowana do podejmowania wyzwań badawczych w obszarach syntetycznej chemii organicznej oraz chemii medycznej. Wyniki prac badawczych podjętych w ramach rozprawy znalazły swój wyraz w cyklu trzech artykułów opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. W tym kontekście na pochwałę zasługuje bardzo ładna szata graficzna artykułów. Przygotowane zostały ze starannością i dbałością o szczegóły. Dodatkowym ich atutem są liczne info-grafiki, co usprawnia analizę danych eksperymentalnych. Niemniej w mojej ocenie doktorat zawiera liczne uchybienia i o takiej opinii przesądza przede wszystkim prowadzony w dysertacji wywód.

Podstawową trudność w przygotowaniu niniejszej recenzji sprawiła mi lektura rozdziału trzeciego (*Przedmiot badań i komentarz*). Zwyczajowo przyjętym jest, że ogół zagadnień poruszanych we wstępie wyznacza tematyka badawcza rozprawy i zawiera elementy niezbędne dla płynnego w nią wprowadzenia. Lecz nie tym razem. Pomijając liczne potknięcia natury redakcyjnej, widać tu (mowa o rozdziale 3.1.) wyraźnie braki warsztatowe doktorantki w formułowaniu myśli, prezentowaniu i rozwijaniu podjętych wątków, nadaniu im właściwej rangi. W sposób bardzo chaotyczny, daleko niewystarczający i niekompletny przedstawia luźne komentarze. Nie bardzo rozumiem, jaką rolę ostatecznie miał on pełnić w rozprawie i po co właściwie go zamieszczono. Trudno tu doszukać się elementarnej logiki wywodu. Twierdzenia i poglądy w nim wyrażone wydają się być nietrafne lub co najmniej skłaniające do polemiki. Są też takie, które budzą wręcz sprzeciw. Podkreślić przy tym trzeba, że prawie zawsze zostały one wyrażone bez rzetelnego uzasadnienia i powołania istotnych argumentów na ich rzecz (w postaci odwołań do źródeł literaturowych), a nawet jeśli takowe się pojawiają to zostały niejako sztucznie „dopasowane” do uzasadnienia tak, by implikowały pożądany wniosek. Ramy recenzji nie pozwalają na uwzględnienie ich wszystkich, dlatego uwaga zostanie zwrócona na wybrane. Pragnę jednakże zaznaczyć, że doceniam poważny wysiłek doktorantki wniesiony w powstanie badań empirycznych oraz ich wartość poznawczą, zaś podniesione zastrzeżenia, jak to zostanie dalej wykazane, nie budzą wątpliwości, że prawne wymogi naukowości w przypadku recenzowanej rozprawy zostały dochowane, co jest ustaleniem kluczowym dla niniejszej recenzji.

Jeżeli już czytelnik jakimś cudem przebrnie przez dziwolągi językowe w stylu, „projektowanie nowych, wielocelowych systemów chemicznych w oparciu o innowacyjne cechy konstrukcyjne”, czy „istotny, ale zbyt niski poziom aktywności biologicznej” albo „kwas oleanolowy jako związek izolowany z surowca naturalnego, doskonale wpisuje się w trendy wykorzystania związków naturalnych”, to i tak zgubi się podążając za tokiem wywodu. Przykładowo, autorka stoi na stanowisku, że „wśród wielu obserwowanych trendów syntetycznych [w poszukiwaniu nowych substancji leczniczych – przyp. red.] wyraźnie dominuje strategia hybrydowa, oparta na chemicznej hybrydyzacji strukturalnej” (s. 15). Pomijając fakt niedochowania staranności dla redakcji wypowiedzi, pogląd ten nie tylko nie jest prawdziwy (zachęcam do systematycznego przeglądu literatury), lecz wyraźnie niespójny z tym wyrażonym uprzednio, cyt. „Aktualnie wiodącym kierunkiem poszukiwań skutecznych leków jest wykorzystanie potencjału farmakologicznego substancji pochodzenia naturalnego. [pominięto przypis]” (s. 11). Zdecydowanie nie podzielam również stanowiska doktorantki, w myśl którego, cyt. „W literaturze naukowej w ostatnich latach pojawiło się wiele nowych kierunków syntetycznych oraz różnorodnych określeń w obszarze nomenklatury, takich jak: heterodimery, koniugaty, koleki, hybrydy i wiele innych. Dla nowo powstałych złożonych indywiduów zaproponowano teorię »konsorcjów molekularnych« [pominięto przypis], które stanowią połączenie różnych elementów aktywnych, mających za zadanie wspólnie wypełnić zaplanowane dla nowego indywiduum działanie w obrębie komórki lub ich zespołu. Pierwszym opisanym tego typu związkiem, powstałym w ramach prac badawczych w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, było połączenie kwasu oleanolowego i aspiryny [pominięto przypis] (...)” (s. 16). Terminy takie jak m.in. związki hybrydowe, koniugaty są bardzo dobrze osadzone w literaturze przedmiotu, kierunki syntetyczne zdefiniowane, zaś wprowadzanie sztucznego terminu „konsorcjum molekularne” niepotrzebnie odwraca uwagę czytelnika i wprowadza w błąd. Jeśli natomiast doktorantka dostrzega różnicę pomiędzy pojęciami „związek hybrydowy” i „konsorcjum molekularne”, to będę prosiła o szerszy komentarz w tym zakresie podczas publicznej obrony. Trudno też zgodzić się ze stwierdzeniem, że pierwszym tego typu związkiem było połączenie kwasu oleanolowego i aspiryny. No chyba że konstrukcja zdania nie oddaje zamysłu i intencji autorki. Biorąc pod uwagę fakt, że doktorantka z wykształcenia jest chemikiem, należy również zauważyć, że kilkukrotnie używa ona sformułowań, które budzą moje poważne wątpliwości. Za niepoprawne z chemicznego punktu widzenia uważam sformułowanie „sprzężony układ wiązań pojedynczych i podwójnych”, bo z definicji jest to po prostu sprzężony układ wiązań. Nie podoba mi się również nazwanie węgla C4 alifatycznym, ponieważ *de facto* jest to atom węgla, wraz z pozostałymi przy nim atomami wodoru, ugrupowania β -dikarbonylowego (1,3-dikarbonylowego), a to już powinna być zasadnicza różnica dla chemika, w szczególności syntetyka.

Ocena merytoryczna rozprawy

Głównym celem rozprawy, który postawiła sobie doktorantka była, najogólniej rzecz ujmując, synteza dwóch serii pochodnych kurkuminy oraz ocena ich potencjału biologicznego. Badania rozpoczyna od syntezy nowych hybrydowych połączeń kurkuminy i jej analogów strukturalnych z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Otrzymane związki chemiczne zidentyfikowała w roztworze z wykorzystaniem metod spektroskopowych – magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C NMR) oraz spektrometrii mas (ESI-MS). Poprzez systematyczną i żmudną pracę syntetyczną pani mgr Katarzyna

Sowa-Kasprzak wykazała możliwość kontrolowania ścieżek reakcyjnych. To bardzo interesująca, a zarazem ważna analiza, wskazująca na dużą biegłość warsztatową doktorantki w zakresie syntezy organicznej. Związki docelowe stanowiły następnie inspirację do podjęcia badań *in silico*, dedykowanych symulacji ich oddziaływań z białkiem wirusa SARS-CoV-2 oraz zgrubnym oszacowaniu bioaktywności i biodostępności. Na dalszym etapie prac doktorantka otrzymała serię hybrydowych połączeń kurkuminy i jej analogów strukturalnych z pochodnymi kwasu oleanolowego, które posłużyły jako związki modelowe do oceny potencjału przeciwnowotworowego zaproponowanego układu hybrydowego, w tym możliwości jego zastosowania w sonodynamicznej terapii nowotworowej. Wyniki tychże badań poczytuję za istotne osiągnięcie naukowe doktorantki, biorąc pod uwagę fakt, iż jest to prawdopodobnie pionierska wzmianka w literaturze na temat potencjalnej możliwości zastosowań hybryd kurkumino-oleanolowych w terapii ultradźwiękowej nowotworów jamy ustnej. Wyniki badań biologicznych wzbogacone zostały symulacjami oddziaływań otrzymanych związków z wytypowanymi na podstawie analizy literaturowej białkami.

W dalszej części recenzji życzyłabym sobie móc zwyczajowo powiedzieć, że jako recenzent czuję się zwolniona ze szczegółowej oceny merytorycznej przedstawionej do oceny dysertacji, bowiem oparta jest ona na cyklu artykułów poddanych rzetelnej analizie merytorycznej dokonanej przez zespół międzynarodowych ekspertów. Niestety, jedną z trudności w przygotowaniu niniejszej recenzji był fakt, że cykl publikacji nie jest wolny od niedociągnięć merytorycznych. Przystępując do wykonania niewdzięcznej roli recenzenta pozwolę sobie przytoczyć kilka przykładowych usterek zaznaczając jednocześnie, że nie należy ich traktować w kategoriach zarzutów merytorycznych, w szczególności dlatego, że niektóre z nich nie stanowią indywidualnego wkładu doktorantki w powstanie artykułów będących przedmiotem postępowania, a jedynie jako wskazówki do dalszej pracy badawczej.

Stosowany (w rozdziale 3.3. oraz artykułach wchodzących w skład cyklu publikacji) język naukowy zdaje się wskazywać na brak zrozumienia przez doktorantkę istoty dokowania molekularnego. Wskazują na to m.in. następujące sformułowania, *cyt.*: "Badania oparte na dokowaniu molekularnym polegają na obliczeniowym dopasowywaniu struktury leku do kieszeni wiążącej odpowiedniego białka" (s. 21), czy „Dla efektu biologicznego kluczowe znaczenie wykazują wzajemne oddziaływania ligand-aminokwas, dlatego w niniejszych badaniach założono, że analizowane pochodne mogą wpływać na poszczególne aminokwasy, co w konsekwencji będzie prowadzić do różnych orientacji ligandów w kieszeni białkowej podczas protokołu dokowania" (s. 21-22) albo „Dla każdego z (...) wcześniej zoptymalizowanych, ligandów (...) uzyskano dziewięć pól, z których pierwsze pozy miały najbardziej ujemną wartość powinowactwa wiązania" (s. 22), czy też „(...) szacunki powinowactwa wiązania w protokole dokowania dla badanych związków mieściły się w przedziale od -8,200 do -10,100 kcal mol⁻¹" (s. 28). Z przytoczonych ogólnikowych sformułowań nie jest jasne, czy doktorantka rozumie jakiego rodzaju dokowanie zostało wykonane (gdyż dopasowanie strukturalne niekoniecznie pokrywa się z dopasowaniem energetycznym). Z kolei w odniesieniu do symulacji oddziaływań ligand-białko opisanych w artykule *Biomedicines* 2023, 11, 1506 należy zauważyć, że autorka nie zawarła tam fragmentu poświęconego ich systematycznej analizie SAR w kontekście wyników badań biologicznych. Lektura artykułu dowodzi, że rozdział 3.3. w nim wyodrębniony (*Computational Analysis*)

raczej nie został wykorzystany problemowo, w odniesieniu do bezpośrednio analizowanej materii, lecz – w moim odczuciu – pełni bardziej funkcję autonomicznego, ornamentacyjnego rozdziału o mocno ograniczonej użyteczności. Mój niepokój budzi również brak zamieszczenia w artykułach opublikowanych na łamach czasopism *Biomedicines* oraz *Acta Poloniae Pharmaceutica* (2023, 80, 289) informacji na temat walidacji procedury dokowania, która pozwoliłaby oszacować wartość predykcyjną uzyskanych wyników.

Osobnym problemem jest brak zrozumienia przez doktorantkę istoty zagadnień związanych z tautomerią związków 1,3-dikarbonylowych. Dowodzi tego stwierdzenie, cyt. „Kurkumina (...) w zależności od warunków środowiska ulega tautomerii keto-enolowej (Rysunek 1). (...) Pomędzy pH 3-7 przeważa forma enolu, co warunkuje płaską konformację przestrzenną. Podwyższenie temperatury lub stężenia związku i alkalizacja środowiska przesuwają równowagę ketonowo-enolową w kierunku formy ketonowej” [zob. rozdz. 3.1, s. 11-12], będące w oczywistej sprzeczności z innym, cyt. “The structure of curcumin is further complicated by the fact that it exhibits keto-enol tautomerism, which can exist in different types of conformers depending on the conditions (49). The bis-keto form dominates in solutions with acidic and neutral pH and is enolized at pH > 8 (50)” [zob. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2023, 80, 289], opartym na dodatek na przyczynkowym doborze literatury [pozycje 49, 50]. Takie stwierdzenia powinny być oparte na dedykowanych badaniach eksperymentalnych (zob. m.in.: (i) Payton, F., Sandusky, P., Alworth, W.L. NMR study of the solution structure of curcumin. *J Nat Prod* 2007, 70, 143, gdzie badano równowagę tautomeryczną kurkuminy w szerokim zakresie pH oraz rozpuszczalnikach o zmiennej polarności, (ii) Tønnesen, H.H., Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids. *Z Lebensm Unters Forsch* 1985, 180, 402, gdzie badano pH-zależną kinetykę procesu tworzenia i stabilności jonów enolanowych, form keto-enolowej oraz enolo-enolowej kurkuminy) lub obliczeniach teoretycznych równowag tautomerycznych wykonanych na odpowiednio wysokim poziomie teorii (m.in. zob. Santin, L.G., Toledo, E.M., Carvalho-Silva, V.H., Camargo, A.J., Gargano R., Oliveira, S.S. Methanol solvation effect on the proton rearrangement of curcumin's enol forms: an *ab initio* molecular dynamics and electronic structure viewpoint. *J Phys Chem C* 2016, 120, 19923, gdzie badano zjawisko wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia protonu w obrębie ugrupowania keto-enolowego kurkuminy; tzw. zjawisko tautomerii enolo-enolowej). Opacznie rozumiane przez doktorantkę zagadnienie tautomerii związków 1,3-dikarbonylowych podaje w wątpliwość wiarygodność analiz SAR oraz obliczeń teoretycznych, w szczególności tych związanych z symulacjami oddziaływań białko-ligand, gdzie równowaga keto-enolo-enolanowa kurkuminy i jej pochodnych ma kluczowe znaczenie przy określaniu względnej selektywności wiązania tautomerów z białkiem. Nie do końca rozumiem też czym kierowała się doktorantka przy przypisywaniu położenia protonu ugrupowania keto-enolowego dla związków niesymetrycznie podstawionych przy ugrupowaniu 1,3-dikarbonylowym (KS3 i KS4, patrz: *Biomedicines* 2023, 11, 1506; rys. 3).

Wydaje się także, że zbyt daleko idący jest pogląd doktorantki, w myśl którego termin „konsorcjum molekularne” miałby być osadzony w literaturze przedmiotu [zob. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2023, 80, 289, cyt.: „In recent years, in scientific literature, many new structural individuals known as »molecular consortia« have appeared (1-4)”. W szczególności, powołanie przypisów (1), (2) oraz (4) na jego poparcie było nieuprawnione.

Wniosek końcowy

Przedstawiony do oceny spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, gdyż potwierdza on ogólną wiedzę doktorantki w dyscyplinie nauki farmaceutycznej, ukazuje jej umiejętność samodzielnego prowadzenia prac badawczych, a przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Ponadto, doktorantka jest współautorką siedmiu prac oryginalnych, trzech prac poglądowych oraz 19 prezentacji posterowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, co dowodzi jej wysokiej aktywności naukowej. **Konkludując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.). Tym samym wnioskuję o dopuszczenie mgr Katarzyny Sowy-Kasprzak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Agotopovetka