

**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Dr hab. Piotr Kowalski, prof. ucz. GUMed
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 GDAŃSK
e-mail: piotr.kowalski@gumed.edu.pl
tel. 58-349-12-36

Gdańsk, 31-08-2022

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

zatytułowanej: „**Zależności struktura-właściwości fizykochemiczne oraz struktura-aktywność biologiczna pochodnych stilbenu**”, złożonej przez Panią **mgr farm. Natalię Piekus-Słomkę** Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w celu uzyskania stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką Pani dr hab. Bogumiły Kupcewicz, prof. UMK.

Podstawa prawna sporządzenia recenzji

Zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz 574 ze zm.) „Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.” Dlatego w recenzowanej dysertacji ograniczę się do tych właśnie aspektów. Ustawowe kryteria uzasadniające otrzymanie stopnia doktora można podzielić na formalne i merytoryczne. Praca została przygotowana na podstawie m.in. dwóch opublikowanych i spójnych tematycznie artykułów (z tym, że jedna z prac ukazała się już po wydrukowaniu spisu publikacji, obejmujących dorobek Doktorantki).

Ocena merytoryczna i metodologiczna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa posiada klasyczny układ czyli posiada wyodrębnianą część teoretyczną i dołączone cele pracy oraz część eksperymentalną obejmującą *Materiały i metody*, *Wyniki i Dyskusję* oraz *Wnioski*. Wraz z załącznikami praca liczy 308 stron. Część teoretyczna została podzielona na podrozdziały obejmujące 38 stron, które wprowadzają czytelnika w świat badań Doktorantki, a wyniki części doświadczalnej to trzy kolejne rozdziały umieszczone na 162 stronach, zaś w części końcowej znaleźć można spis literatury, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz dorobek naukowy. Rozprawa doktorska została opatrzona 66 rysunkami, 36 tabelami oraz 173 odnośnikami literaturowymi (prawie wszystkie angielskojęzyczne). Wprawdzie w tekście numeracja kończy się na 35-tej tabeli, jednakże w tekście rozprawy zamieszczone są dwie różne tabele oznaczone tym samym numerem 11. Tabela 10 została w tekście oznaczona jako Tabela X.

Należy zaznaczyć, że materiał zawarty w dysertacji został częściowo opublikowany w jednej publikacji zatytułowanej „Hybrid *cis*-stilbene molecules: novel anticancer agents” w **International Journal of Molecular Sciences** (załączonej do dorobku naukowego) oraz drugiej “Methoxy and methylthio-substituted *trans*-stilbene derivatives as CYP1B1 inhibitors – QSAR study with detailed interpretation of molecular descriptors” w **Arabian Journal of Chemistry** (niezałączonej do dorobku a wydanej w sierpniu 2022)

Doktorantka w swoich pracach badawczych zafascynowała się strukturą składającą się z dwóch pierścieni fenylowych połączonych mostkiem etylenowym, pewnie nie tylko z powodu szerokiego spektrum aktywności biologicznej tych związków w kierunku działania przeciwzapalnego, cyto-, kardio- i neuroprotektoryjnego, ale również przeciwcukrzycowego, przeciwmiażdżycowego a nawet depigmentacyjnego, ale przede wszystkim ze względu na to, że pochodne stilbenu pozwalają na szereg badań, oceniających ilościowo zależności struktura-właściwości (QSPR) oraz struktura-aktywność (QSAR). Najbardziej obiecującą aktywnością biologiczną nowo zsyntezowanych pochodnych *cis*-stilbenu jest działanie antymitotyczne i antyangiogenne. Najpopularniejszymi, naturalnie występującymi pochodnymi stilbenu są resweratrol, kombretastatyna oraz pterostilben, z kolei syntetycznymi są kłomifen, tamoksifen oraz raloksifen. Do projektowania hybrydowych związków przeciwnowotworowych wykorzystano już wcześniej m.in. struktury stilbenów a rosnące zainteresowanie hybrydami przeciwnowotworowymi zaowocowało w ciągu ostatnich kilku lat dużą liczbą doniesień na temat projektowania, syntezy oraz bioewaluacji tych hybryd.

Badania realizowane przez Doktorantkę stanowią nieodłączny element poszukiwania nowych związków, wykazujących poszukiwaną aktywność biologiczną i działanie farmakologiczne. Określenie tych zależności może przyczynić się do przyspieszenia i ograniczenia kosztów poszukiwania nowych substancji, o pożądanych właściwościach. Obecność wiązania nienasyconego w strukturze stilbenu umożliwia utworzenie dwóch form diastereoizomerycznych konfiguracji *trans* i *cis*, które jak wykazały badania różnią się zarówno we właściwościach, jak i kierunku działania farmakologicznego. Godnym uwagi jest fakt, że Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała nie tylko związki opisane już w literaturze (pochodne *trans*), lecz również skutecznie przeprowadziła próby otrzymania nowych pochodnych o konfiguracji *cis*. Możemy stąd określić niniejszą pracę jako syntetyczno-analityczną. Nowe pochodne *cis*-stilbenu Autorka charakteryzowała za pomocą temperatury

topnienia oraz analiz chromatograficznych i spektroskopowych. Tożsamość związków potwierdzona została poprzez wykonanie widm IR oraz ^1H NMR i ^{13}C NMR.

Za główny cel pracy zostało obrane wyznaczenie ilościowych zależności między strukturą związków, opisaną z użyciem różnych deskryptorów molekularnych (wyznaczonych na podstawie zoptymalizowanej geometrii związków czy ułożenia cząsteczek w sieci krystalicznej), a właściwościami tych związków takimi jak: zdolność do inhibicji izoenzymu CYP1B1, fluorescencja w stanie stałym, współczynnik podziału oktanol-woda ($\log P$). Realizacja założonych celów wykonana została przez Doktorantkę przy udziale szeregu metod chemometrycznych: wielokrotnej regresji liniowej (MLR), regresji metod cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), regresji wektorów nośnych (SVM) oraz algorytmu K-najbliższych sąsiadów (KNN). Autorka słusznie uznała za istotne tylko te z obliczonych modeli regresyjnych, które spełniały wybrane kryteria walidacji. Istotnym wynikiem badań było wykazanie wpływu wybranych elementów strukturalnych pochodnych *trans*-stilbenu (głównie metoksylowych i metyloliolowych) na zdolność do inhibicji izoenzymu CYP1B1. Analizie poddano 24 cztery związki, których aktywność wyrażona została jako ujemny log wartości IC50 (pIC_{50}), podzielono na dwie grupy: 20 związków (jako zestaw uczący) i 4 związki jako zestaw testowy. Zbiór uczący został wykorzystany do doboru zmiennych i budowy modeli. Pozostałe związki zawarte w zestawie testowym wykorzystano do oceny predykcyjnej wydajności modeli. Deskryptory molekularne obliczono za pomocą oprogramowania alvaDesc po optymalizacji związku w pakiecie Gaussian 09 w PL-Grid.

Identyfikacja elementów kluczowych dla tej aktywności została przeprowadzona przez Autorkę na drodze interpretacji skomplikowanych trójwymiarowych deskryptorów molekularnych. Wyniki uzyskanych badań wskazują również, na wpływ występujących w sieci krystalicznej oddziaływań międzycząsteczkowych na wydajność kwantową fluorescencji w stanie stałym pochodnych *trans*-stilbenu. Ponadto zidentyfikowano zależność między elektrofilowością związków, a właściwościami fluorescencyjnymi. Zdolność do emisji zaabsorbowanego światła w postaci fluorescencji, którą charakteryzowały się badane związki w stanie stałym stwarza potencjalne możliwości wykorzystania ich w optoelektronice.

Jeden z celów badawczych wymagał syntezy nowych pochodnych *cis*-stilbenu o usztywnionym wiązaniu podwójnym (co zapobiega izomeryzacji *cis-trans*), w których strukturę wprowadzono grupę karboksylową. Element ten, jak słusznie zauważyła Autorka, jest kluczowy z punktu widzenia zaplanowanych dalszych prac nad otrzymaniem połączeń hybrydowych z kwasami hydroksamowymi, co wpisuje się w aktualne trendy w procesie otrzymywania nowych związków aktywnych biologicznie.

Co więcej rezultatem przeprowadzonych badań było także wyznaczenie wartości współczynnika $\log P$ dla pochodnych *cis*- i *trans*-stilbenu, co ma kluczowe znaczenia dla przewidywania losów przyszłych leków w organizmie człowieka. Przeprowadzone badania umożliwiły skonstruowanie modelu predykcyjnego pozwalającego przewidywać wartość współczynnika $\log P$ na podstawie struktury związków (pochodnych *cis* i *trans* stilbenu), co stanowiło jeden z czterech zamierzonych i osiągniętych celów pracy.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka wyciągnęła słuszne wnioski:

1. Analiza QSAR wraz z pogłębioną interpretacją trójwymiarowych deskryptorów molekularnych pozwoliła na zdefiniowanie elementów w strukturze *trans*-stilbenów odpowiedzialnych za zdolność do inhibicji izoenzymu CYP1B1. Doktorantka zaznaczyła, że zarówno obecność podstawnika w pozycji 2 jednego z pierścieni fenylowych, jak i wymiana

atomu tlenu na atom siarki oraz ograniczenie liczby podstawników do trzech korzystnie wpływają na modelowaną aktywność biologiczną. Ponadto badania potwierdziły użyteczność chemometrycznej metody – analizy skupień w ocenie modeli predykcyjnych.

2. Wydajność kwantowa fluorescencji w stanie stałym metoksylowych pochodnych *trans*-stilbenu jest zależna od występujących w sieci krystalicznej słabych oddziaływań międzycząsteczkowych oraz elektrofilowości związku.

3. Obecność grupy COOH w strukturze 1,4,5-trzypodstawionych imidazoli pochodnych *cis*-stilbenu istotnie osłabiała ich właściwości cytotoksyczne. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność w pierwszej kolejności zsyntezowanie i ocenę właściwości połączeń hybrydowych, w których fragment *cis*-stilbenowy będzie miał układ podstawników obu pierścieni fenyłowych identyczny z kombretastatyną A4.

4. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz stanowi doskonałe narzędzie do wyznaczania współczynnika log P, którego wartość może być prognozowana z wykorzystaniem metody MLR (w oparciu o trzy deskryptory) lub metody PLSR. Analiza deskryptorów wchodzących w skład zbudowanych modeli predykcyjnych dowodzi, że wartość log P pochodnych stilbenu zależy od trójwymiarowej struktury związków.

Nie mam zastrzeżeń dotyczących zarówno samej rozprawy, jak i merytorycznej strony zebranych publikacji, przedstawionych do oceny, jako rozprawa doktorska. Zarówno te załączone do rozprawy artykuły, jak i ten moim zdaniem najcenniejszy artykuł (jeszcze niedołączony a opublikowany w sierpniu 2022r), zostały przecież już wcześniej gruntownie ocenione przed opublikowaniem przed odpowiednich recenzentów, będących specjalistami w tematyce.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszej tematyki badawczej uważam za niezwykle istotne w odniesieniu do rozwoju nauk farmaceutycznych. Kierunek prowadzonych badań jest innowacyjny i uzasadniony z naukowego punktu widzenia. Natomiast realizację podjętej tematyki, poprzez wykorzystanie narzędzi pozwalających na identyfikację wpływu zmian w strukturze chemicznej związków na obserwowane właściwości i aktywność, uważam za nowatorską i pozwalającą w przyszłości ograniczyć koszty badań eksperymentalnych. Problemy, które Doktorantka skutecznie usiłowała rozwiązać należą do trudnych i dość skomplikowanych, a tematyka dotycząca omawianych zależności stanowiła wyzwanie zarówno dla Doktorantki jak i dla recenzenta.

Doktorantka spełnia wymagania ustawowe dotyczące ogólnej wiedzy teoretycznej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, jak również zapraszania do współpracy zespoły potrzebne do realizacji założonego celu. Należy podkreślić, że praca napisana jest poprawnym językiem, z dbałością o stronę merytoryczną. Zamieszczone w poszczególnych rozdziałach treści dowodzą wiedzy Doktorantki (zarówno w temacie syntezy, jak i analizy związków) oraz umiejętności studiowania i analizowania problemów badawczych na podstawie odpowiednio dobranego piśmiennictwa. Niewątpliwie, całość rozprawy stanowi właściwe przeprowadzenie zaplanowanych do realizacji celów badań i interpretacji otrzymanych wyników.

Ocena dorobku

Doktorantka jest absolwentką (z roku 2012) Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, gdzie na Wydziale Farmaceutycznym ukończyła studia magisterskie na kierunku farmacja. Od 2012 r swą karierę związała z Katedrą

i Zakładem Biofarmacji a od 2015 r z Katedrą Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. Ponadto, Pani magister ma pokaźne doświadczenie dydaktyczne w prowadzeniu zajęć dla studentów kierunku farmacja i kosmetologia, co więcej pracowała w aptekach i była wykładowcą w Policealnym Studium Farmaceutycznym „ESAN”. Dotychczasowa działalność badawcza Doktorantki została uhonorowana przyznaniem szeregu nagród oraz stypendium Rektora za najwyższej punktowane publikacje. W życiorysie Doktorantki warto zaznaczyć kierownictwo grantu służącego rozwojowi młodych naukowców numer MN-8/WF/2016s

Całkowity dorobek naukowy Doktorantki (przedstawiony w pracy) stanowi **14 publikacji** i o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF = 24,65** i liczbą punktów MNiSW = 865. Jednakże warto wspomnieć, że w pod koniec sierpnia 2022 r ukazała się drukiem jeszcze jedna bardzo ważna praca o **IF 6.13**, w **Arabian Journal of Chemistry**, która bezpośrednio związana jest z tematem dysertacji i której Doktorantka jest pierwszym autorem. Pani Magister jest również współautorem 14 prac przedstawionych na krajowych i zagranicznych zjazdach bądź konferencjach naukowych.


Niewątpliwie cechą charakterystyczną całego dorobku doktorantki jest brak współautorstwa promotorki w opublikowanych przez Doktorantkę pracach, zamieszczonych w rozprawie. Jednakże ten najcenniejszy artykuł z **Arabian Journal of Chemistry 2022** rekompensuje wcześniejsze luki. Obie prace bezpośrednio związane z tematem rozprawy zostały przyjęte do druku w czasopiśmie o bardzo wysokiej randze naukowej.

Oprócz publikacji będących podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalia Piekuś- Słomka jest bardzo prężnie działającym naukowcem o znaczącym dorobku naukowym. Informacje dotyczące szczegółowego dorobku naukowego zostały zamieszczone na końcu niniejszej rozprawy i wskazują na duże zaangażowanie Doktorantki w popularyzację nauki.

Wniosek końcowy

Po analizie przedłożonej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że wnosi ona cenny wkład w poszerzenie wiedzy w zakresie zaproponowania nowych wyników w temacie zależności struktura-właściwości fizykochemiczne oraz struktura-aktywność biologiczna dla pochodnych stilbenu i ich potencjalnego wykorzystania jako środków wykazujących aktywność biologiczną. Należy podkreślić, że opiniowana rozprawa doktorska zasługuje na uznanie, bowiem świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym, jak i opanowaniu warsztatu analitycznego Doktorantki. Tym samym uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Piekuś-Słomki spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.). Na tej podstawie **wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu o nadanie mgr Natalii Piekuś-Słomce stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.**

Dr hab. Piotr Kowalski, prof. GUMed

PROFESOR NADZWYCZAJNY
KATEDRY I ZAKŁADU CHEMII FARMACEUTYCZNEJ

dr hab. n. farm. Piotr Kowalski, prof. nadzw. GUMed