



dr hab. inż. Anna Kajetanowicz, prof. UW
Laboratorium Syntezy Metaloorganicznej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 25 kwietnia 2025

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Olgi Ciupak

„Analogi strukturalne i koniugaty kwasu foliowego jako nowe inhibitory sulfatazy steroidowej (STS).”

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Olgi Ciupak podsumowuje prace badawcze wykonane przez Doktorantkę na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem dr. hab. inż. Sebastiana Demkowicza, prof. PG oraz promotora pomocniczego, dr. inż. Mateusza Daśko. Głównym celem badań było opracowanie nowych inhibitorów sulfatazy steroidowej (STS), będących analogami strukturalnymi kwasu foliowego, związku niezbędnego między innymi do efektywnego wzrostu komórek nowotworowych, a także jego koniugatów. Badania te dobrze wpisują się w obszar zainteresowań Promotorów i są odpowiedzią na istotny problem społeczny jakim jest wzrastająca zachorowalność oraz umieralność na choroby nowotworowe. Dysertacja została napisana w języku polskim i posiada strukturę zgodną z powszechnie obowiązującymi standardami przyjętymi dla prac doktorskich z dyscypliny nauki chemiczne. Praca doktorska liczy 256 stron i została podzielona na cztery główne części: *Część teoretyczną*, *Badania własne*, *Podsumowanie* oraz *Część eksperymentalną*. Całość została poprzedzona podziękowaniami, spisem treści, wykazem skrótów i symboli oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. W dość nieoczekiwanym miejscu, między podsumowaniem a częścią eksperymentalną, znalazły się informacje dotyczące dorobku naukowego Doktorantki. Dysertację kończy *Bibliografia*, która stanowi wykaz 126 pozycji literaturowych cytowanych w rozprawie oraz wykaz rysunków, schematów i tabeli.

Rozdział zatytułowany *Część teoretyczna*, mgr inż. Olga Ciupak rozpoczyna od przedstawienia światowych trendów dotyczących zachorowalności na nowotwory, które potwierdzają zasadność podjęcia opisanej w dysertacji tematyki badawczej, następnie wprowadza czytelnika we właściwości sulfatazy steroidowej, enzymu, który przekształca nieaktywne biologicznie siarczany hormonów steroidowych w ich aktywne pochodne oraz opisuje znane inhibitory tego enzymu wraz z wadami i zaletami wynikającymi z ich budowy. W kolejnych podrozdziałach *Części teoretycznej* Doktorantka koncentruje się na funkcjach kwasu foliowego w organizmie człowieka, zaznacza nadekspresję receptorów tego związku w komórkach nowotworowych oraz prezentuje zastosowanie pochodnych kwasu foliowego oraz jego koniugatów w wykrywaniu i leczeniu nowotworów.

Rozdział *Badania własne* obejmuje trzy podrozdziały, z których każdy poświęcony jest syntezie odrębnej serii potencjalnych inhibitorów sulfatazy steroidowej. Każdy z projektów badawczych Doktorantka rozpoczynała od badań dokowania molekularnego, które umożliwiło wytypowanie najbardziej obiecujących struktur. Następnie przechodziła do syntezy wybranych



dr hab. inż. Anna Kajetanowicz, prof. UW

Laboratorium Syntezy Metaloorganicznej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

związków, a kolejnym etapem była ocena ich aktywności biologicznej, we współpracy z dr. hab. Maciejem Masłykiem z Wydziału Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu Instytutu Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego – zarówno w testach enzymatycznych z wykorzystaniem izolowanej sulfatazy steroidowej, jak i na wybranych liniach komórkowych.

Pierwszym zadaniem Doktorantki było opracowanie serii związków, analogów inhibitorów STS wcześniej zaprojektowanych i otrzymanych przez Promotora, w których pierścień fenyłowy połączony z ugrupowaniem amidosiarczanowym został zastąpiony układem naftalenowym, co miało zwiększyć ich podobieństwo do cząsteczki kwasu foliowego zawierającego dwa skondensowane pierścienie heterocykliczne. W wyniku wieloetapowej syntezy, wykorzystującej jako kluczowy etap 1,3-dipolarną cykloaddycję z wykorzystaniem azydków, Doktorantka otrzymała 12 nowych pochodnych z wydajnościami 26-70%. Część z nich dawała obiecujące wyniki w badaniach *in vitro*, zarówno w teście enzymatycznym jak i komórkowym, chociaż ich aktywność ustępowała dodanemu do porównania irosustowi, innemu inhibitorowi STS, który dotarł do drugiej fazy badań klinicznych. Co istotne, wyniki eksperymentalne były zbieżne z danymi uzyskanymi podczas badań dokowania molekularnego. To czego mi tutaj zabrakło, to uwzględnienie najlepszej pochodnej zawierające pierścień fenyłowy, opracowanej wcześniej przez Promotora i służącej jako punkt wyjścia do tego projektu.

Kolejna grupa związków zawierała fragment pochodzący od kwasu glutaminowego lub jego estrów, co upodabniało ją do cząsteczki kwasu foliowego, oraz różne rdzenie – 1,2,3-triazolu, kumaryny, flawonu oraz tyraminy – łączące część pochodzącą od aminokwasu z fragmentem zawierającym ugrupowanie amidosiarczanowe. Ponownie, konkretne struktury zostały zaproponowane na podstawie badań dokowania molekularnego, a wieloetapowe syntezy pozwoliły na uzyskanie biblioteki 8 kandydatów na inhibitory sulfatazy steroidowej. (Tutaj zastanawia mnie, czy próbowała Pani bezpośrednio hydrolizować związek **IVA** do pochodnej **IVB**?) Związki te wykazywały pewną aktywność hamującą działanie STS, ale żaden z nich nie osiągnął wyników zbliżonych do tych uzyskiwanych przy zastosowaniu irosustatu. Remedium na niską aktywność związków opartych na szkielecie triazolu okazało się wprowadzenie atomów fluoru do pierścienia fenyłowego znajdującego się w ich strukturze; aktywność tak uzyskanych pochodnych znacząco wzrosła i tylko w niewielkim stopniu ustępowała tej uzyskanej przez irosustat. Dodatkowo, dla tej serii sprawdzono, czy cząsteczki te mogą być selektywnie transportowane przez receptory α kwasu foliowego. W tym celu komórki posiadające receptory Fa α inkubowano z roztworem zawierającym kwas foliowy oraz badany inhibitor, a uzyskany wynik porównano z eksperymentem, w którym nie użyto kwasu foliowego. W obu przypadkach Doktorantka zaobserwowała zbliżony wynik co sugeruje, że otrzymany inhibitor dostaje się do komórki bezpośrednio przez błonę biologiczną lub inny niepoznany jeszcze mechanizm, natomiast jego transport przez receptor jest zahamowany.

Ostatni projekt dotyczył syntezy koniugatu kwasu foliowego wyselekcjonowanego ponownie z wykorzystaniem dokowania molekularnego. Projekt ten był najtrudniejszy pod względem syntetycznym, ale Doktorantka poradziła sobie i z tym wyzwaniem. Przed przystąpieniem do badań biologicznych sprawdziła jeszcze, czy otrzymany koniugat ulega rozpadowi uwalniając cząsteczkę inhibitora i jak długo to trwa. Następnie przeprowadziła badania biologiczne wskazujące obiecujące właściwości otrzymanego związku.

Część eksperymentalna rozprawy jest bardzo obszerna i zawiera szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych, charakterystykę spektroskopową otrzymanych związków oraz



wydajności poszczególnych reakcji. Pokazuje ona ogrom pracy włożony przez Doktorantkę w zaprojektowanie i syntezę potencjalnych inhibitorów sulfatazy steroidowej. W tej części zabrakło mi jednak informacji o masach i ilościach moli otrzymanych produktów, a także nieco bardziej precyzyjnych opisów procedur syntetycznych. Przykładowo, nie jest jasne, w jaki sposób dodawano roztwory związków **91A–L** do mieszaniny reakcyjnej – przez chłodnicę zwrotną, czy też przez dodatkową szyję kolby (str. 169) – co jest istotne z punktu widzenia powtarzalności opisu eksperymentu. Dodatkowo, w załączonych danych spektroskopowych pojawiają się pewne nieścisłości – widma masowe nie spełniają standardów wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HR-MS), ponieważ różnice między wartościami obliczonymi a zmierzonymi przekraczają 5 ppm. W niektórych widmach NMR jest za dużo (np. dla związków **88**, **IIB** czy **91L**) lub za mało (np. dla związków **95**, **109**, **126** czy **137K**) sygnałów, co zwłaszcza w tym ostatnim przypadku się zdarza, ale przydałby się komentarz. Zastanawia mnie również, jak liczona była wydajność dla związku **100** (98%), skoro Doktorantka odzyskiwała nieprzereagowany substrat.

Praca jest estetyczna, liczne ilustracje ułatwiają śledzenie toku rozumowania, ale zabrakło starannej korekty edytorskiej, znalazłam sporo literówek, błędów gramatycznych, stylistycznych, niezręczności językowych czy też określeń pochodzących z żargonu laboratoryjnego. Z recenzenckiego obowiązku wymienię kilka z nich:

- „trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne” (str. 30);
- Na schemacie 1.1 testosteron ma błędną strukturę (str. 33);
- „Zajmowała się ona badaniami kobiet w ciąży oraz tropikalnej anemii” (str. 42);
- Częsteczką kwasu foliowego na schemacie 1.4 oraz 1.5 na różny układ wiązań w części pterydynowej; wprowadzie w literaturze funkcjonują obie struktury i dodatkowo forma aromatyczna, ale prosiłabym o jakiś komentarz w tej sprawie;
- „Temat ten został zgłębiony przez wykonanie znacznej ilości badań” (str. 48);
- „organometaliczny element $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ” (str. 56);
- „Fragment ten odpowiedzialny jest za kompleksowanie jonów lantanowców. W powyższej publikacji atomem takim jest gal, jednak w literaturze odnaleźć można również przykłady z wykorzystaniem indu czy lutetu.” (str. 57), w tej grupie tylko lutet jest lantanowcem;
- strzałka z dwoma grotami pomiędzy różnymi formami adduktu wody do cząsteczki leku na schemacie 1.15 (w jego środkowej części) powinna być zastąpiona dwoma strzałkami w przeciwnych kierunkach (str. 66); ta pierwsza jest zarezerwowana dla struktur rezonansowych;
- „charakteryzują się tym, iż różnią się one między sobą” (str. 69);
- „w przypadku wysoce toksycznych ilościach dawek” (str. 72);
- „Moja decyzja poparta była wystąpieniem możliwych interakcji” (str. 121);
- „cząsteczki mającej zawierającą fragment inhibitora” (str. 138);
- „Na kolejnych chromatografach” (str. 143) i ten sam błąd powtórzony na rysunkach 3.7-3.10;
- „sygnału resztowego” (str. 161);



dr hab. inż. Anna Kajetanowicz, prof. UW

Laboratorium Syntezy Metaloorganicznej
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

-
- „Analizy HPLC oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej” (str. 161);
 - „korzystając z rotatora”;
 - błędna struktura drugiego związku na stronie 185 (powinien być to związek **105** będący estrem *tert*-butylowym) oraz pierwszego związku na stronie 186 (powinien być to związek **IIIa** będący pochodną amidosiarczanową);
 - „chlorowodorek esteru dimetylowego” oraz „wysuszono z wykorzystaniem” (strona 194);
 - „pozostawiono w stanie mieszania” (str. 199);
 - opis widma ^1H NMR dla związku **137H** jest opisem dla eteru metylowego, a nie etylowego (str. 206);
 - TMSCl użyty w przepisie zamiast TBDMS (strona 230);

przy czym te potknięcia nie wpływają na moją pozytywną ocenę recenzowanej pracy.

Podsumowując, Kandydatka z sukcesem zrealizowała postawione przed nią cele badawcze, wykorzystując technikę dokowania molekularnego wyselekcjonowała bibliotekę 36 nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, zaprojektowała wieloetapowe syntezy pozwalające na ich uzyskanie, a następnie skutecznie przeprowadziła syntezę i charakterystykę otrzymanych struktur. Aktywność biologiczna tych związków została zbadana dzięki współpracy z zespołem dr. hab. Macieja Małyka z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego, a uzyskane wyniki wskazują na wysoki potencjał terapeutyczny badanych związków. Ponadto, bogaty materiał eksperymentalny zawarty w pracy świadczy o biegłości Doktorantki w stosowaniu różnorodnych technik laboratoryjnych oraz o jej umiejętnościach w zakresie samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Uważam, że praca doktorska mgr inż. Olgi Ciupak bez wątpienia spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j.: Dz.U. 2023 r. poz. 742 z późn. zm.), dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.