



Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
Prof. Paweł Kafarski
e-mail: pawel.kafarski@pwr.wroc.pl



Wrocław 09.03.2015

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr inż. Szymona KŁOSSOWSKIEGO
„Synteza nowych inhibitorów układu tioredoksyna – reduktaza tioredoksyny”

Pan mgr inż. Szymon Kłossowski pracę doktorską wykonał w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk. Promotorem rozprawy jest Pan prof. Ryszard Ostaszewski a sama dysertacja jest przykładem bardzo solidnego i przemyślanego projektu naukowego. Szacunek budzi uporczywe dążenie Doktoranta do osiągnięcia postawionych sobie celów i wyróżnia się ona elegancją wykonania.

Celem jaki postawił sobie mgr. Inż. Szymon Kłossowski było otrzymanie biblioteki peptydomimetyków zawierających N-końcowy fragment zdolny wiązać się z dwiema położonymi blisko siebie resztami tiolowymi tioredoksyny i hamować redukcję insuliny przez układ dwóch enzymów - tioredoksynę i jej reduktazę. Jako związki wyjściowe wybrano peptydomimetyki acylowane znanym inhibitorem tego procesu - kwasem 3-bromo-2-bromopropionowym, a jako sposób konstrukcji tych peptydomimetyków reakcję Ugi.

W tym miejscu chciałbym stwierdzić, że nazywanie tej reakcji (mimo, że powszechne w Polsce) „reakcją Ugiego” mnie razi. Wikipedia używa terminu „reakcja Ugi”, ale za to dla równowagi - „reakcja Suzukiego”.

Przeprowadzone badania aktywności inhibitorowej wykazały, że nie posiadają one aktywności, ale pozwoliły postawić hipotezę, że prawdziwym fragmentem strukturalnym warunkującym inhibicję kowalencyjną jest kwas 2-(bromometylo)akrylowy powstający z kwasu 3-bromo-2-bromopropionowego w reakcji eliminacji bromowodoru. Peptydomimetyki zawierające fragment tego kwasu (otrzymane również w reakcji Ugi) okazały się obiecującymi inhibitorami, ale nie wykazywały spodziewanej aktywności wobec komórek nowotworowych. Doktorant tłumaczy to zbyt dużą reaktywnością tych połączeń (reagują z

wieloma nukleofilami w komórce) i konsekwentnie zaproponował nowy fragment N-końcowy wprowadzając w kwasie 2-(bromometylo)akrylowym w miejsce bromu reszty aryloksykarbonylowe. Takie związki okazały się być bardzo dobrymi inhibitorami redukcji insuliny przez badany układ enzymów, ale ciągle nie wykazywały aktywności wobec komórek nowotworowych. Tym niemniej, stosując opracowane procedury pan mgr. inż. Szymon Kłossowski otrzymał większą bibliotekę peptydomimetyków i osiągnięto pełny sukces – otrzymano dobre inhibitory badanego układu tioredoksyna-reduktaza tioredoksyny, które powodowały również silne hamowanie proliferacji komórek rakowych. Tak więc, uporczywe dążenie do osiągnięcia celu praktycznego zostało nagrodzone.

Praca Pana mgr inż. Szymona Kłossowskiego jest jednak typową pracą z zakresu syntetycznej chemii organicznej. Badał on różnorakie warianty reakcji Ugi, wpływ budowy substratów i warunków na przebieg tej reakcji i zastosował z sukcesem 2,4,-dimetoksybenzyloaminę jako chiralny pomocnik. W tym ostatnim celu trzeba było opracować efektywną metodę otrzymywania gramowych ilości tej aminy w postaci enancjomerycznie czystej. Udało się to dopiero po zastosowaniu hydrolizy N-acylowanej chiralnej aminy w reakcji katalizowanej lipazami. Doktorant zbadał również możliwość zastosowania lipaz jako katalizatorów w tej reakcji. Mimo że nie udało się w ten sposób uzyskać dyskryminacji chiralnej ten fragment badań jest bardzo wartościowym elementem pracy doktorskiej.

Reasumując, praca doktorska pana mgr inż. Szymona Kłossowskiego to przykład bardzo udanego i dobrze wykonanego projektu badawczego. O jego znaczeniu naukowym świadczy fakt, że wyniki tej pracy zostały opublikowane w trzech wartościowych publikacjach. O znaczeniu praktycznym tych badań świadczy fakt, że uzyskane wyniki są obiektem dwóch patentów – polskiego i międzynarodowego.

Praca napisana jest dobrze. Szczególnie chciałbym podkreślić bardzo staranne napisanie części eksperymentalnej i bardzo dobre uzasadnienie celu przeprowadzonych badań. Omówienie wyników również uważam za mocną stronę pracy chociaż zebrałbym je w nieco innej kolejności - ale jest to rzecz gustu. Wstęp stanowi 1/3 objętości pracy, a więc ma standardową objętość dla rozpraw doktorskich. Jest on jednak napisany bardzo nierówno. Widać, że pan mgr inż. Szymon Kłossowski jest chemikiem gdyż podrozdziały poświęcone reakcji Ugi są napisane ciekawie i ze znanstwem rzeczy. Natomiast część poświęcona układowi badanych enzymów (tioredoksyna i jej reduktaza) napisana jest dość nieporadnie.

Szczególnie dotyczy to fragmentu poświęconego inhibitorom tego systemu. Rozdział zatytułowany *Wnioski*, jest *de facto* streszczeniem wykonanych badań.

Redakcja pracy jest przemyślana, choć sama praca sprawia wrażenie jakby była pisana w pewnym pośpiechu. Świadczy o tym dość częste stosowanie żargonu i skrótów myślowych. Spośród nich wymienię kilka, a mianowicie:

- nazywanie zjawisk powodujących trudności „problematycznymi”. Mimo że słowo to przyjęło się wśród młodego pokolenia to jest po prostu brzydkie (np. „problematyczna reakcja” na str 13);
- „zwiększenie objętości reakcji” to skrót myślowy (str. 23). Niska rozpuszczalność reagentów wymaga zwiększenia ilości użytego rozpuszczalnika i tyle;
- nie ma pojęcia „nienaturalna reakcja” - są reakcje nie katalizowane przez enzym w Naturze a zachodzące w specyficznych warunkach;
- kompleksy metali nie zawierają w swej strukturze atomu, ale jon metalu (str. 35) a złoto nie jest związkiem, ale pierwiastkiem (str 35);
- nie badano wpływu związków **122a** i **122b** na proliferację komórek nowotworowych, a więc podanie, że nie hamują one tego procesu w stężeniu w stężeniach >50 mikromoli jest nieprawidłowe;
- nie lubię określenia „odbezpieczanie” na usunięcie grup chroniących. Kojarzy mi się ono raczej z bronią palną;
- protestuję przeciw „podstawieniu solą cezową” (str. 74)
- nie ma „izolowanego układu enzymatycznego” (str 76 i 77);

Praca liczy 130 stron i w takim dziele trudno jest uniknąć omyłek redakcyjnych. Pierwsza pojawia się już w spisie publikacji Doktoranta. Pozostałe na stronach: 3, 21, 24, 37, 47, 65 (kilka razy), 70 i 71. To niewiele i nie będę ich wymieniał, choć jestem ciekaw czy Doktorant je znajdzie.

Obowiązkiem recenzenta jest też wymienienie uchybień merytorycznych i zadanie pytań dotyczących problemów niejednoznacznych. Nie uchylam się od tego obowiązku - a oto one:

- reakcje redukcji wiązań podwójnych, choć rzadkie występują w Naturze. Co więcej znany jest jeden przykład katalizowanej przez enzym reakcji Dielsa-Aldera (str. 18);

- wykres energii w trakcie przebiegu reakcji (Rycina 1, str. 19) jest błędny gdyż dotyczy dwóch konkurujących reakcji jednoetapowych a sugeruje, dwuetapowy przebieg jednej reakcji (str. 19);
- brak skuteczności związków **122a** i **122b** wobec badanego układu enzymatycznego nie musi wynikać ze znacznie większego rozmiaru cząsteczki potencjalnego inhibitora. Przyczyną może być też fakt, że N-alkilowanie azotu wiązania amidowego nie pozwala aby wiązanie peptydowe było płaskie;
- na stronie 67 należało podać wartość skręcalności optycznej mimetyka (*R*)-**123b**, mimo że jest ono podane w części eksperymentalnej (str. 104). Nawiasem mówiąc tam jest brak znaku skręcalności („+”);
- brak aktywności antyproliferacyjnej związku **309h** niekoniecznie wynika tylko z jego lipofilowości. Może o tym decydować transport tej substancji przez błonę komórkową;
- czy wiadomo jest czy izocyjanooctan reaguje z lipazami?
- aby zbadać czy aktywność enzymatyczna lipaz jest odpowiedzialna za katalizę reakcji Ugi, wykonano reakcje ze zdenaturowanymi enzymami. Denaturacja powoduje dużą zmianę struktury białka – proponowałbym sprawdzić jak działa albumina.

Wszystkie przedstawiono powyżej uwagi i wątpliwości nie umniejszają mojej opinii, że rozprawa pana dr inż. Szymona Kłossowskiego to bardzo dobra praca doktorska, której realizacja wymagała dużego nakładu pracy, dobrej wiedzy chemicznej i wysokiej sprawności manualnej.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr inż Szymona Kłossowskiego spełnia wszystkie warunki, zarówno ustawowe jak i zwyczajowe, jakie stawia się pracom doktorskim i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie o dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Praca jest bardzo ciekawa, porusza niezwykle ważny aplikacyjnie problem a uzyskane wyniki to sukces Doktoranta. Wobec tego praca zasługuje na wyróżnienie stosowną nagrodą. Stawiam zatem wniosek o jej nagrodzenie, wniosek poparty tym, że wyniki doktoratu zostały opublikowane w postaci trzech prac i dwóch patentów. Warto dodać, że pan Szymon Kłossowski jest współautorem trzech prac naukowych, które nie korzystają z wyników jego pracy doktorskiej, a dodatkowa praca jest wysłana do druku.

