



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Prof. dr hab. inż. Barbara Gawdzik
Instytut Chemii
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
ul. Uniwersytecka 7
25-406 Kielce
b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 3.07.2025

Ocena Pracy doktorskiej Pani mgr Marty Jędrzejczyk

pt. „Synteza, analiza strukturalna i badanie aktywności biologicznej
pochodnych salinomycyny”

Podstawę opracowania stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu nr 70/2024/2025, odnośnie powierzenia mi sporządzenia recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Jędrzejczyk pt. „Synteza, analiza strukturalna i badanie aktywności biologicznej pochodnych salinomycyny” podjęta na posiedzeniu w dniu 25 kwietnia 2025 roku.

Nowotwory należą niezaprzeczalnie do chorób cywilizacyjnych XXI wieku, są jedną z głównych przyczyn zgonów i stanowią poważny problem społeczny. W związku z wciąż rosnącą zachorowalnością na choroby nowotworowe oraz licznymi ograniczeniami w ich leczeniu, kluczowym wyzwaniem współczesnej medycyny jest pokonywanie dynamicznego wzrostu oporności komórek nowotworowych na standardowo stosowane leki. Jedną z nowych strategii w poszukiwaniu związków, mających na celu przeciwdziałanie lekooporności na powszechnie stosowane w terapii onkologicznej leki przeciwnowotworowe jest projektowanie układów, które stanowią połączenie różnych mechanizmów działania.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Marty Jędrzejczyk doskonale wpisuje się w ten aktualny obszar badań nad poszukiwaniem nowych regio- i stereoselektywnych strategii syntezy i modyfikacji strukturalnych związków o działaniu przeciwnowotworowym i przeciwbakteryjnym, stanowiąc kontynuację badań realizowanych przez zespół Pana Profesora Adama Huczyńskiego.

Dysertacja doktorska została zredagowana na podstawie trzech prac naukowych (Molecular structure and spectroscopic studies of the product of acidic degradation of salinomycin and its potassium salt, *Journal of Molecular Structure*, 1263 (2022) 133129; Rate of translocation across lipid bilayer of triphenylphosphonium-linked salinomycin derivatives contributes significantly to their K^+/H^+ exchange activity on membranes, *Bioelectrochemistry*, 145 (2022) 108089; Anticancer activity of salinomycin quaternary phosphonium salt, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 282 (2025) 117055), których kopie zostały załączone, rozpoczyna od zamieszczenia streszczeń w języku polskim oraz języku angielskim.

W następnym rozdziale zostały jasno i precyzyjnie zdefiniowane cele pracy:

- analiza strukturalna i zbadanie jonoforetycznych właściwości produktów rozpadu salinomycyny w środowisku kwaśnym;
- opracowanie i optymalizacja procesu syntezy pochodnych salinomycyny z kationem trifenylofosfoniowym i jego analogami;
- zbadanie właściwości przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych oraz elektrofizjologicznych zsyntezowanych pochodnych salinomycyny.

W rozdziale zatytułowanym „Wprowadzenie” Doktorantka przedstawiła ogólną charakterystykę stosowanych metod leczenia nowotworów, jak również ich ograniczenia i skutki uboczne. Szerzej zaprezentowała zalety i przewagę nad standardowymi terapiami onkologicznymi terapii celowanej w macierzyste komórki nowotworu. Na kolejnych stronach części teoretycznej opisała aktywność biologiczną salinomycyny w korelacji do jej struktury molekularnej. Z dużym zainteresowaniem czytałam na temat wzrostu aktywności biologicznej w stosunku do komórek nowotworowych i antybiotykoopornych szczepów bakterii połączeń kationu trifenylofosfoniowego z konwencjonalnymi lekami przeciwnowotworowymi i przeciwbakteryjnymi oraz ich roli w pokonywaniu lekooporności.

Podsumowując, uważam, że teoretyczna część pracy, zwięźle napisana na podstawie 39 pozycji literaturowych, przedstawia najbardziej istotne zagadnienia, które dobrze korespondują z problematyką badań wpisanych w dysertację doktorską.

W rozdziale „Omówienie wyników badań” Doktorantka prezentuje rezultaty prac badawczych uzyskane podczas realizacji zadań wpisanych w zakres pracy doktorskiej. Przeprowadzone badania można podzielić na dwa obszary tematyczne:

- przeprowadzenie procesu degradacji salinomycyny z udziałem kwasu mrówkowego i analiza otrzymanych produktów (podrozdział A),
- synteza oraz określenie budowy i aktywność biologicznej pochodnych salinomycyny zawierających w swej strukturze ugrupowanie trifenylofosfoniowe (podrozdział B).

Badania nad reakcją rozkładu salinomycyny w środowisku kwasu mrówkowego prowadzone zostały w oparciu o doniesienia literaturowe. Ponadto Doktorantka przeprowadziła analogiczne reakcje z udziałem kwasu fosforowego(V) i kwasu octowego. Analiza rentgenostrukturalna struktur krystalicznych jednego z dwóch produktów rozkładu salinomycyny **I-2** oraz jego soli potasowej **I-2-K** jednoznacznie potwierdziła ich budowę, a także umożliwiła określenie konfiguracji absolutnej asymetrycznych atomów węgla. Kolejnym etapem badań przedstawionych w artykule opublikowanym w *Journal of Molecular Structure* było zbadanie właściwości jonoforetycznych pochodnej **I-2** i jej soli potasowej **I-2-K** odpowiednio w oparciu o analizę potencjału elektrostatycznego i analizę rentgenograficzną. Metodą spektrometrii mas (ESI-MS) została potwierdzona zdolność do kompleksowania kationów metali Na⁺, K⁺ oraz Rb⁺ przez produkt degradacji salinomycyny **I-2**. Dodatkowo, metodą spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) zostały zbadane struktury pochodnej **I-2** i jej soli potasowej **I-2-K** w stanie stałym oraz w roztworze dichlorometanu. Uzupełnienie badań strukturalnych stanowią wyniki analiz: elementarnej i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HETCOR, ¹H-¹³C HMBC).

Kolejnym etapem badań było opracowanie strategii syntezy dwóch pochodnych salinomycyny zawierających ugrupowanie estrowe w pozycji C1 oraz czteroetapowego procesu otrzymywania pochodnej salinomycyny, której atom węgla C20 został podstawiony ugrupowaniem tiazolowym. Należy podkreślić, że zwykle w całym procesie otrzymywania związków organicznych, zwłaszcza tym wieloetapowym, najbardziej skomplikowanym i czasochłonnym jest proces izolowania z mieszaniny poreakcyjnej produktów reakcji. Realizując ten etap badań Doktorantka opracowała i zoptymalizowała metodę separacji otrzymanych trifenylofosfoniowych analogów salinomycyny, z wykorzystaniem systemu

CombiFlash®Rf+ sprzężonego z detektorem rozpraszania światła ELS i spektrometrią mas (ESI-MS).

Właściwości jonoforetyczne wszystkich trzech trifenylofosfoniowych analogów salinomycyny zostały przetestowane z wykorzystaniem liposomów obciążonych fluorescencyjnym wskaźnikiem pH – pyraniną oraz mitochondriów izolowanych: mitochondriów niewykazujących potencjału błonowego i z aktywnym potencjałem błonowym. Dalsza część badań, których wyniki zostały opublikowane w *Bioelectrochemistry* dotyczyła określenia zdolności przenikania trifenylofosfoniowych pochodnych salinomycyny przez dwuwarstwowe błony lipidowe. W obu przypadkach najaktywniejszą pochodną salinomycyny okazała się pochodna zawierająca podstawnik trifenylofosfonianotiazolowy w pozycji C20.

Trzyście estrowych pochodnych salinomycyny w tym jedenaście nowych, jak dotąd nieopisanych w literaturze, zostało otrzymanych w wyniku dwuetapowego procesu, którego pierwszy etap polegał na reakcji salinomycyny z 1,4-dibromobutanem lub 1,6-dibromohexanem z katalitycznym udziałem DBU w roli silnej zasady. Natomiast drugim etapem była reakcja substytucji nukleofilowej S_N2 zsyntezowanej bromokarboalkoksyłowej pochodnej salinomycyny z wybraną fosfiną.

Oczywistą konsekwencją wpisaną w temat pracy doktorskiej było określenie aktywności biologicznej zsyntezowanych fosfoniowych estrowych pochodnych salinomycyny, których strukturę Doktorantka potwierdziła standardowymi metodami analizy spektroskopowej. Przetestowała *in vitro* aktywność przeciwproliferacyjną dla pięciu linii komórkowych: nowotworu prostaty (PC3), raka piersi (MDA-MB-231), gruczolaka jelita grubego (SW480), gruczolaka jelita grubego z przerzutami (SW620), a także niedrobnokomórkowego raka płuc (A549). Poza aktywnością cytostatyczną zbadana została również toksyczność wszystkich pochodnych salinomycyny w stosunku zdrowych linii komórkowych ludzkich keratynocytów (HaCaT) oraz fibroblastów chomika chińskiego (V79). Wymierną informacją na temat selektywności działania cytostatycznego fosfoniowych pochodnych salinomycyny było wyznaczenie współczynnika selektywności SI.

W przypadku linii komórek nowotworowych raka piersi (MDA-MB-231) i płuc (A549) zbadano wpływ dwóch estrowych pochodnych salinomycyny, zawierających w swej strukturze ugrupowanie trifenylofosfoniowe i tri-*n*-butylofosfoniowe oraz niezmodyfikowanej strukturalnie salinomycyny i jej estru benzylowego na aktywność

mitochondriów, cykl komórkowy oraz obecność reaktywnych form tlenu (ROS), a zatem sprawdzono ich rolę w procesie inicjowania apoptozy, co jest jednoznaczne z aktywnością przeciwnowotworową.

W rozprawie doktorskiej Autorka przedstawiła wyniki przeprowadzonych testów nad aktywnością przeciwbakteryjną, do których zostały wybrane dwa szczepy bakterii Gram-ujemnych oraz sześć szczepów bakterii Gram-dodatnich. Zsyntezowane fosfoniowe pochodne salinomycyny okazały się nieaktywne w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, a w stosunku do bakterii Gram-dodatnich wykazały niższą aktywność niż nefunkcjonalizowana salinomycyna i referencyjny lek cyprofloksacyna.

Ostatni etap badań polegał na analizie wpływu wybranych estrowych pochodnych salinomycyny na szybkość oddychania komórkowego w komórkach raka płuc (A549), a także określenia ich właściwości elektrofizjologicznych przy zastosowaniu techniki czarnych błon komórkowych.

W rozdziale 7 Autorka rozprawy doktorskiej dokonała podsumowania przeprowadzonych badań oraz wnioski, których liczbę, moim zdaniem, mogła ograniczyć, gdyby połączyła niektóre z nich o podobnej treści: np. te dotyczące zdolności transferu kationów przez błony biologiczne, czy te, wynikające z badań aktywności przeciwnowotworowej.

W zestawieniu literaturowym znalazł się wykaz 61 publikacji, które zostały zacytowane w tekście dysertacji. Do każdej z trzech publikacji, które stały się kanwą dysertacji zostały załączone oświadczenia współautorów, które potwierdzają znaczący wkład Autorki w ich powstanie.

Dla mnie, jako recenzenta, istotnym uzupełnieniem tematyki badawczej jest zamieszczony wykaz dorobku naukowego, na który składa się: dziesięć publikacji, sześć patentów, pięć wystąpień ustnych i jedna prezentacja posterowa na konferencjach krajowych i międzynarodowych, udział w dwóch projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz kierowanie dwoma projektami, które Doktorantka realizowała dzięki programowi Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza. Jestem przekonana, że powyższe fakty miały istotny wpływ na ukształtowanie postawy naukowej Autorki dysertacji doktorskiej i jednocześnie są świadectwem Jej dojrzałości naukowej.

Przechodząc do uwag, które wynikają z powierzonej mi roli recenzenta, pragnę zwrócić uwagę, że Autorce nie udało się uniknąć błędów natury językowej i edytorskiej, które nie umniejszają merytorycznej wartości dysertacji. Podczas publicznej obrony pracy doktorskiej, proszę o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- dlaczego ta sama pochodna salinomycyny w pracy doktorskiej ma dwa różne oznaczenia **II-6** i **III-3a**, co moim zdaniem nie ułatwia jej lektury, podobnie jak fakt niezamieszczenia wykazu stosowanych w tekście pracy skrótów i akronimów,
- czy były podjęte próby syntezy analogów strukturalnych estrowych trifenylofosfoniowych pochodnych salinomycyny **II-6** i **II-5**, które zawierałyby odpowiednio podstawnik butylotrifenylfosfoniowy w pozycji C20 lub podstawnik tiazolotrifenylfosfoniowy w pozycji C1? Tego typu modyfikacja strukturalna uzupełniłaby badania wpływu położenia tych podstawników na właściwości jonoforetyczne pochodnych salinomycyny,
- przedstawienie kryteriów wyboru pochodnych **III-3a** i **III-3f**, dwóch z jedenastu nowych otrzymanych analogów strukturalnych salinomycyny, zawierających w swej strukturze ugrupowanie trifenylofosfoniowe i tri-*n*-butylofosfoniowe do badań nad wpływem na funkcjonalność mitochondriów komórek nowotworowych raka piersi (MDA-MB-231) i raka płuc (A549),
- wyjaśnienie dlaczego produkty reakcji chemicznych modyfikacji strukturalnych salinomycyny zostały nazwane koniugatami,
- doprecyzowanie czy traktowane w pracy, jako synonimy pojęcia „rak piersi (MDA-MB-231)” i „nowotwór piersi (MDA-MB-231)” można stosować wymiennie oraz czy jest jakakolwiek różnica między tymi pojęciami?

Dokonując oceny wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że do najważniejszych, w mojej opinii, osiągnięć naukowych Pani magister Marty Jędrzejczyk zaliczam:

- wyizolowanie i scharakteryzowanie pod względem strukturalnym jednego z dwóch produktów degradacji polieterowego jonoforowego

antybiotyku – salinomycyny w środowisku kwaśnym, a także potwierdzenie zachowania jego właściwości jonoforetycznych w stosunku do kationów Na^+ , K^+ i Rb^+ ,

- opracowanie i optymalizacja kilkuetapowego procesu regioselektywnej modyfikacji strukturalnej salinomycyny, w wyniku którego zsyntezowano jedenaście nowych fosfoniowych pochodnych salinomycyny oraz zbadanie ich właściwości biofizycznych i przeciwnowotworowych w stosunku do pięciu linii ludzkich komórek nowotworowych, a także przeciwbakteryjnych wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jak również analiza korelacji pomiędzy strukturą (długością linkera alkilowego i rodzajem kationu fosfoniowego) a aktywnością biologiczną.

Analizując cele sprecyzowane przez Promotora i Doktorantkę oraz założone kierunki badań, które mają kluczowe znaczenie dla projektowania nowych skutecznych leków, zwłaszcza wobec wciąż rosnącej wielolekowej oporności (MDR) komórek rakowych i drobnoustrojów, nie mam wątpliwości, że tematyka badań prowadzonych w ramach dysertacji doktorskiej jest ważna i ciekawa, a uzyskane wyniki mają wartość poznawczą i aplikacyjną dla obszaru syntezy organicznej i chemii medycznej.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji dysertacja autorstwa Pani magister Marty Jędrzejczyk zatytułowana: „Synteza, analiza strukturalna i badanie aktywności biologicznej pochodnych salinomycyny” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pani magister Marty Jędrzejczyk do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

Próbne podpis