

---

Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
**prof. dr hab. Dorota Gabriela Piotrowska**

---

Łódź 15 października 2024

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Martyny Malinowskiej zatytułowanej**

***„Enancjoselektywne reakcje Betti’ego w warunkach katalizy dwufazowej.***

***Aktywność biologiczna otrzymanych zasad Betti’ego” przedstawiona Komisji***

**Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinach nauki chemiczne w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, realizowana w ramach interdyscyplinarnych studiów doktoranckich Łódzkiej Uczelni Publicznych InterChemMed, została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Anny Zawiszy, prof. uczelni z Zakładu Katalizy i Syntezy Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego oraz dr hab. inż. Izabeli Witońskiej, prof. uczelni z Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Wydziału Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Zadaniem badawczym jakiego podjęła się mgr Martyna Malinowska była synteza wybranych organokatalizatorów z zamiarem zbadania ich aktywności katalitycznej w asymetrycznej reakcji Betti’ego. Ważnym uzupełnieniem prowadzonych interdyscyplinarnych prac było zbadanie aktywności przeciwnowotworowej wyselekcjonowanych produktów (zasad Betti’ego). Tematyka pracy wpisuje się w ważny nurt badawczy współczesnej chemii organicznej i związana jest z potrzebą opracowania metod syntezy związków enancjomerycznie czystych. Pozyskiwanie związków enancjomerycznie czystych jest wyzwaniem z punktu widzenia syntezy organicznej, nie można również pominąć istotnego aspektu praktycznego wynikającego z zapotrzebowania na odpowiednie enancjomery o określonej aktywności biologicznej w farmacji i medycynie. Biorąc pod uwagę powyższe, badania podjęte przez Doktorantkę są w pełni uzasadnione.

Przedstawiona do oceny rozprawa to liczące ponad 180 stron opracowanie przygotowane w oparciu o monotematyczny cykl trzech prac, z których dwie opublikowano w czasopiśmie *Molecules*, zaś trzecia w chwili składania dokumentacji znajdowała się w fazie recenzji. Biorąc pod uwagę fakt, że większa część rozprawy powstała w oparciu o wyniki prac opublikowanych, wysoko należy ocenić pracę jaką mgr Malinowska wykonała przygotowując bardzo obszerny autoreferat, który swoją objętością de facto niewiele różni się od klasycznych prac doktorskich przygotowywanych w postaci monografii. Praca podzielona została na 8 rozdziałów: *Wstęp, Część literaturowa, Omówienie wyników badań własnych,*

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1  
tel. (042) 677 92 33  
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl  
www.umed.pl

*Podsumowanie, Część eksperymentalna, Bibliografia, Publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz Oświadczenia współautorów. Całość uzupełniają Wykaz stosowanych skrótów, Streszczenie rozprawy doktorskiej, Summary of Pd.D Thesis oraz opis dotychczasowej Aktywności naukowej Doktorantki (pełen wykaz publikacji naukowych, udziałów w sympozjach i konferencjach, projektach badawczych, odbytych praktykach zagranicznych oraz członkostwo w organizacjach naukowych).*

Opis wyników prac własnych poprzedza, przygotowany w oparciu o rzetelne i krytyczne studia literatury przedmiotu, przegląd dotychczasowych osiągnięć w zakresie metod otrzymywania enancjomerycznie czystych w oparciu o rozdzielanie mieszanin racemicznych, a także syntezę asymetryczną, ze szczególnym uwzględnieniem organokatalizy. Ze względu na podjęte badania szczególnie wartościowy jest opis dotychczasowych osiągnięć w zakresie wykorzystania w reakcjach enancjoselektywnych katalizatorów tiomocznikowych, squaramidowych i tiosquaramidowych. Osobny podrozdział poświęcono doniesieniom literaturowym opisującym asymetryczny wariant reakcji Betti'ego. Ta część doskonale uzasadnia podjęty wątek badawczy, a jednocześnie dowodzi, że Doktorantka potrafi pozyskiwać informacje w oparciu o dane literaturowe i krytycznie je analizować.

Cel i zakres pracy zostały zdefiniowane w sposób logiczny i przejrzysty, a poszczególne cele badawcze racjonalnie zaplanowane. W pierwszej kolejności Doktorantka wyselekcjonowała serię dwufunkcyjnych organokatalizatorów tiomocznikowych (7 związków **03.1-03.7**) i tiosquaramidowych (4 związki **03.8-03.11**) z zamiarem wykorzystania ich w reakcji 1- i 2-naftoli z *N*-tosyloiminą oraz 6-hydroksychinoliny z *N*-Boc-ketiminą. Należy podkreślić, że użycie katalizatorów tiosquaramidowych jest pomysłem oryginalnym w aspekcie ich zastosowań w reakcjach Bettiego. Wybór katalizatorów do badań nie był przypadkowy; zapewniono skuteczność kompleksowania z substratami poprzez obecność w strukturze katalizatorów trzeciorzędowej funkcji aminowej w odpowiedniej odległości od atomu azotu funkcji tioamidowej; co więcej katalizatory zaprojektowane zostały z zamiarem określenia wpływu podstawników przy tioamidowych atomach azotu na przebieg badanych reakcji. Na uznanie zasługuje przemyślany dobór podstawników, który w założeniu dawał szanse porównania efektywności katalizatorów pomiędzy dwoma badanymi grupami związków (pochodne tiomocznikowe vs. tiosquaramidowe). W większości przypadków wykorzystano procedury literaturowe, skutecznie je modyfikując. Należy podkreślić, że Doktorantka nie ograniczała się do pozyskania katalizatorów w ilościach wystarczających do przeprowadzenia zaplanowanych reakcji Bettiego, ale podjęła trud optymalizacji warunków reakcji w celu zwiększenia wydajności, np. w ostatnim etapie syntezy katalizatorów tiosquaramidowych w miejsce tradycyjnych metod rozpuszczalnikowych sięgnęła po mechanochemiczne metody syntezy, znacząco zwiększając wydajności reakcji. To bardzo dobrze świadczy o technice pracy Doktorantki, jej doskonałym przygotowaniu warsztatowym, a także dowodzi znajomości aktualnych trendów w chemii organicznej i umiejętności ich

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1  
tel. (042) 677 92 33  
e-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl  
www.umed.pl

właściwego wykorzystania. Badania efektywności otrzymanych katalizatorów w reakcji Betti'ego poprzedzono metodyczną optymalizacją warunków z użyciem katalizatora **03.1** w modelowej reakcji 1-naftolu z *N*-tosyloiminą. Wykazano, że spośród badanych pochodnych tiomocznikowych związki z ugrupowaniem piperydynylowym oraz dimetyloaminowym, a także podstawnikiem 3,5-bis(trifluorometylo)fenylowym (odpowiednio **03.1** i **03.3**) efektywnie katalizują reakcje prowadząc do utworzenia produktów z wysoką wydajnością (98%) i enancjoselektywnością (*ee* odpowiednio 80 i 68%). Zastosowane przez Doktorantkę po raz pierwszy w reakcji Betti'ego katalizatory tiosquaramidowe **03.8-03.11** efektywnie katalizowały reakcję, choć uzyskano produkty z niższą enancjoselektywnością (*ee* 16-56%). Jednocześnie zauważono nieco wyższe wydajności i enancjoselektywności w reakcjach katalizowanych pochodnymi tiosquaramidowymi w stosunku do analogicznych reakcji, w których zastosowano odpowiednie ich chlorowodorki. Następnie zbadano przebieg reakcji 2-naftolu z *N*-tosyloiminą, wykazując, że o ile zastosowanie dwufunkcyjnych pochodnych tiomocznikowych prowadzi do uzyskanie produktów o względnie niskich czystościach enancjomerycznych (*ee* 6-61%), to użycie pochodnych tiosquaramidowych, zarówno w postaci wolnych amin, jak i chlorowodorków, nieznacznie zwiększa czystość enancjomeryczną produktów (*ee* 46-71%). W dalszym rozszerzeniu zbadano przebieg reakcji 6-hydroksychinoliny oraz obu naftoli z *N*-Boc-ketiminą, wykazując skuteczność katalizatora tiomocznikowego **03.7** (*ee* odpowiednio 98, 78 i 48%). Na wysoką ocenę zasługują podjęte przez Doktorantkę próby wyjaśnienia stereochemicznego przebiegu wyżej wspomnianych reakcji (Schematy 3.5, 3.9). Zaproponowano przebieg reakcji poprzez stan przejściowy zakładający tworzenie trójskładnikowego kompleksu pomiędzy dwufunkcyjnym katalizatorem (tiomocznikowym albo tiosquaramidowym) i substratami. Doktorantka słusznie postuluje, że zarówno organokatalizatory tiomocznikowe jako i tiosquaramidowe wspomagają reakcję aktywując *N*-tosyloiminę/*N*-Boc-ketiminę poprzez utworzenie wiązania wodorowego, a także zwiększając nukleofilowość naftoli/6-hydroksychinoliny poprzez ich oddziaływanie z fragmentem trzeciorzędowej aminy.

Kontynuując poszukiwania skutecznych katalizatorów reakcji Bettiego mgr Malinowska przetestowała skuteczność trzech kolejnych serii katalizatorów, tj. (1) pochodne tiomocznikowe (**03.35-03.36**) i mocznikowe (**03.37-03.38**) zawierające pierścienie węglowodanowe, (2) azirydynokarbinole (**03.39-03.45**) oraz (3) fosfiny (**03.46-03.49**) i tlenki fosfin (**03.50-03.51**) z pierścieniem azirydynowym, które wcześniej stosowano z powodzeniem w zespole w innych reakcjach stereoselektywnych. Jako testową ponownie wybrano reakcję 1-naftolu z *N*-tosyloiminą. Spośród badanych pochodnych najlepszymi katalizatorami okazały się pochodne azirydynokarbinolowe, a wśród nich najefektywniejszym związkiem był **03.39**, którego użycie pozwoliło na uzyskanie odpowiedniego produktu reakcji o czystości enancjomerycznej 60%.

Biorąc pod uwagę potencjalny aspektu aplikacyjnego, tj. możliwość zastosowania katalizatorów w większej skali, wysoko oceniam zamysł heterogenizacji systemu katalitycznego poprzez absorpcję homogenicznego katalizatora na powierzchni porowatych nośników. Doktorantka podjęła się niełatwego zadania otrzymania skutecznych systemów katalitycznych w oparciu o wyselekcjonowany do badań homogeniczny katalizator **03.1** oraz łatwo dostępne stałe nośniki (C, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), a w dalszym rozszerzeniu modyfikacji powierzchni adsorbentów miedzią, amoniakiem albo etylenodiaminą oraz zbadania ich aktywności katalitycznej w reakcji Bettiego 1-naftolu z *N*-tosyloiminą. Realizacja tego zadania niewątpliwie stanowiła wyzwanie, wymagała powiem osadzenia katalizatora na odpowiednim nośniku, a następnie ocenienia skuteczności osadzania (ilościowa analiza HPLC), podjęto również próby ustalenia które grupy funkcyjne na adsorbencie i heterogenicznych katalizatorach są dostępne dla substratów w warunkach syntezy (wykorzystanie spektroskopii IR). Mimo że aktywność otrzymanych katalitycznych układów heterogenicznych była niższa w porównaniu z aktywnością modelowego systemu homogenicznego z **03.1**, to podkreślić należy, że podjęte przez Doktorantkę próby zastosowania w reakcji Bettiego katalizatora typu Takemoto immobilizowanego na porowatych adsorbentach są pionierskie, a uzyskane wyniki stanowią doskonały punkt wyjścia do dalszych badań.

Bardzo wysoko oceniam kolejne zadanie badawcze jakiego podjęła się mgr Malinowska, polegające na próbie otrzymania serii pochodnych zasad Betti'ego funkcjonalizowanych wyselekcjonowanymi D- i L-aminokwasami [(R)-walina, (S)-fenyloalanina, (S)-prolina, (S)-kwas glutaminowy, (S)-asparaginowy i S-leucyna] z zamiarem oceny ich potencjału przeciwnowotworowego, choć szkoda, że nie uzasadniono wyboru odpowiednich aminokwasów. Synteza zaprojektowanych związków obejmowała otrzymanie estrów metylowych odpowiednich aminokwasów, a następnie ich przekształcenie w reakcji z 2-naftolem i aromatycznymi aldehydami w odpowiednie aminobenzylonaftole **3.56-3.65** (zasady Bettiego). Doktorantka racjonalnie uzasadnia odbywającą się w warunkach reakcji częściową racemizację pochodnych aminokwasów. Czy rozważano użycie w reakcji Betti'ego odpowiednich aminokwasów zawierających czwartorzędowy atom węgla alfa (Ca)? Oceniono właściwości cytotoksyczne otrzymanych w tej części projektu zasad Betti'ego **3.56-3.62** i **3.65**, z pominięciem słabo rozpuszczalnych związków **3.63** i **3.63**. Studia te uzupełniono o badania ADME, w celu określenia profilu farmakokinetycznego testowanych związków. Podjęto również próbę analizy oddziaływań badanych związków z potencjalnymi celami molekularnymi. Najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek BxPC-3 wykazywała pochodna **3.58** (IC<sub>50</sub> = 13.26 μM), zaś wobec linii HT-29 związek **3.60** (IC<sub>50</sub> = 11.55 μM). Na pochwałę zasługuje uwzględnienie oceny wpływu badanych związków na komórki prawidłowe (badanie przeżywalności zdrowych fibroblastów człowieka WI-38). Doktorantka wykazała wyższą cytotoksyczność najaktywniejszych pochodnych **3.58** i **3.60** wobec komórek nowotworowych przy ich marginalnym wpływie na żywotność komórek prawidłowych, dlatego też zostały one wyselekcjonowane do dalszych

badań (ocena właściwości proapoptotycznych). W dalszym rozszerzeniu, w oparciu o badania *in silico* potwierdzono, że badane związki wykazują cechy podobne do leków (druglikeness) i korzystne właściwości farmakologiczne, w tym wysoką wchłaniałość z przewodu pokarmowego oraz zdolności przenikania przez barierę krew-mózg.

W podsumowaniu prac badawczych podkreślić należy szeroki zakres przeprowadzonych prac eksperymentalnych, racjonalnie zaplanowanych i konsekwentnie zrealizowanych. Trafnie dobrano metody syntetyczne i odpowiednie narzędzia analityczne. Doktorantka wykazała się biegłością w interpretacji wyników i formułowaniu wniosków. Zwraca uwagę staranna szata graficzna pracy i korekta edytorska. Dobrym rozwiązaniem, ułatwiającym analizę tekstu z jednoczesnym korelowaniem treści z odnośnikami literaturowymi, było uwzględnienie wszystkich pozycji literaturowych w postaci spójnego spisu oraz równocześnie w formie przypisów dolnych na odpowiednich strona.

Podsumowując część autoreferatową przygotowaną przez mgr Martynę Malinowską należy również podkreślić, że została ona napisana starannie, poprawnym językiem, choć Doktorantce nie udało się uniknąć kilku pomyłek i błędów edytorskich, czy niezręcznych sformułowań, o których wspominam jedynie z obowiązku recenzenta:

- str. 107, schemat 3.3 – we wzorze **3.23**, w miejscu atomu tlenu pomiędzy podstawnikiem bis(trifluorometylo)fenylovym a fragmentem cykloput-3-en-1,2-dionu powinno być NH;
- str. 108 – zdanie „*Badanie ilości użytego organokatalizatora wykazało, że optymalne było zastosowanie 10% molowych katalizatora **03.1**, podczas gdy 5% molowych i 30% molowych nie skutkuje poprawą indukcji asymetrycznej*” jest nieprecyzyjne, sugeruje bowiem, że we wspomnianych warunkach z użyciem zarówno mniejszej jak i większe ilości katalizatora uzyskiwane czystości enancjomeryczne produktów są na podobnym poziomie, podczas gdy w rzeczywistości są znacząco niższe;
- str. 135, schemat 3.12 – w przedstawionych na schemacie warunkach reakcji aminokwasy przekształcane są w chlorowodorki estrów odpowiednich aminokwasów, a nie estry aminokwasów;
- str. 136, schemat 3.13 – zamiast podawać wzory odpowiednich diastereoizomerycznych racemicznych zasad Bettiego zapisane analogicznymi wzorami jedynie z odpowiednimi dyskryptorami konfiguracyjnymi przy numerze związku, np. **3.58** [(S,S)/(R,R)] i **3.59** [(S,R)/(R,S)], bardziej przejrzyste byłoby podanie dwóch niezależnych wzorów ze wskazaniem jednego z enancjomerów oraz wskazaniem dyskryptorów konfiguracyjnych obu enancjomerów.

- str. 137 – Doktorantka wyjaśnia, że „ze względu na słabą rozpuszczalność związków **3.63** i **3.64** nie były one poddane dalszym testom” zatem zapis „związki **3.56-3.65**” pojawiający się kilkakrotnie w opisie wyników badań biologicznych (str. 138, 140) jest mylący, sugeruje bowiem, że wszystkie związki poddawano ocenie aktywności biologicznej.

Powyższe uwagi dotyczą drobnych uchybień i w żadnym stopniu nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy. Należy podkreślić, że mgr Martyna Malinowska realizując interdyscyplinarny projekt precyzyjnie i w sposób w pełni przemyślany zaplanowała i zrealizowała poszczególne zadania badawcze. Uzyskane podczas realizacji pracy wyniki poddawała wnikliwej analizie, a wnioski wykorzystywała w kolejnych etapach pracy.

Mgr Martyna Malinowska jest młodym naukowcem, o bardzo dobrym dorobku naukowym, na który składają się 4 prace oryginalnych z listy JCR. W swoim dorobku posiada również 21 komunikatów zaprezentowanych na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Była kierownikiem projektów finansowanych w ramach programu Studenckie Granty Badawcze UŁ. Odbyła dwa krótkoterminowe zagraniczne wjazdy stażowe (ERASMUS+ Friedrich-Schiller-University Jena, Niemcy, oraz CEEPUS, Transilvania University of Brasov, Rumunia).

**Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Martyny Malinowskiej spełnia wymagania ustawowe (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami*). Wnoszę zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska