

---

Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
**Prof. dr hab. n. farm. inż. Dorota Gabriela Piotrowska**

---

Łódź 9 kwiecień 2024

**Recenzja pracy doktorskiej mgra inż. Piotra Grześkowiaka zatytułowanej**

***„Synthesis and Evaluation in vitro of Novel Arginine Analogues as Potential New  
Components of Metabolic Anticancer Therapy”***

**przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki  
Warszawskiej w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Marioli Koszytkowskiej-Stawińskiej i prof. dr hab. Marii Jolanty Rędownicz w ramach interdyscyplinarnych studiów doktoranckich TRI-BIO-CHEM realizowanych przez trzy jednostki partnerskie tj. Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Zadaniem badawczym jakiego podjął się mgr inż. Piotr Grześkowiak było zaprojektowanie i synteza nowych analogów argininy o wysokim potencjale terapeutycznym w terapii wykorzystującej głodzenie argininowe.

Dysertacja przygotowana została w języku angielskim w postaci monografii, w klasycznej formie powszechnie przyjętej dla prac doktorskich o charakterze doświadczalnym i zawiera 9 głównych rozdziałów zatytułowanych odpowiednio: *Introduction, Tools, Biological evaluation, Aims, Results, Discussion, Summary and conclusions, Methods, Bibliography* oraz *Appendices*. Całość uzupełniono o streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz użytych skrótów.

Opis prac własnych poprzedzony został krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorant przedstawił charakterystykę argininy, jej metabolizm oraz rolę w rozwoju nowotworów. Tak skonstruowany wstęp dobrze wprowadza w podjętą tematykę badawczą i doskonale uzasadnia podjęte modyfikacje strukturalne argininy zmierzające do otrzymania nowych skutecznych terapeutyków. Jak Doktorant słusznie zauważył, arginina odgrywa kluczową rolę w wielu szlakach metabolicznych. O ile w zdrowych tkankach arginina jest syntezowana endogennie, to niektóre mutacje w komórkach nowotworowych powodują, że komórki stają się zależne od egzogennych źródeł argininy. Zastąpienie zatem argininy jej toksycznym odpowiednikiem

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

należy postrzegać jako obiecujące podejście terapeutyczne w zwalczaniu komórek nowotworowych.

Cel i zakres pracy zostały jednoznacznie zdefiniowane, a poszczególne cele badawcze racjonalnie zaplanowane. W tym miejscu należy podkreślić interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań. Wyniki prac badawczych Doktorant opisał w kolejnych podrozdziałach, a na wysoka ocenę zasługuje logiczny układ, wynikający z następczości podejmowanych działań. Autor posłużył się racjonalnym podejściem w projektowaniu nowych struktur, polegającym na zastosowaniu modelowania *in silico*. Takie podejście pozwala przeanalizować dużą liczbę struktur związków, w stosunkowo krótkim czasie, a następnie wyselekcjonować te o największym potencjalne.

Doktorant zaproponował ogólny wzór analogów argininy (Rys. 31, str. 34), zakładając, że w odpowiednich pochodnych zachowana zostanie konfiguracja absolutna L-aminokwasu oraz fragment guanidynowy argininy albo jej izosteryczny odpowiednik, zaś oba te fragmenty zostaną oddzielone odpowiednim linkerem. Zaprojektowane zostały trzy grupy pochodnych: (1) analogi z pierścieniem 1,2,3-triazolowym wprowadzonym jako fragment łączący (*linker*) – 8 związków (**1a-1h**) (Tabela 2, str. 36); (2) analogi naturalnych i syntetycznych aminokwasów z alifatycznym linkerem albo ich odpowiednie homologii – 13 związków (**2a-2m**) (Tabela 3, str. 37); (3) analogi z częścią 1,2,3-triazolu albo tetrazolu jako bioizosteru guanidyny – 22 związki (**3a-3v**) (Tabela 4, str. 38-40). Doktorant w bardzo przejrzysty sposób koreluje struktury poszczególnych pochodnych z wzorem ogólnym poprzez zastosowanie odpowiedniej kolorystyki ważnych fragmentów strukturalnych w związkach **1** (Rys. 2 vs. Tabela 2); szkoda, że w dalszej części Autor zrezygnował z tej formy prezentacji (Tabela 3 i 4).

Wszystkie wyżej wymienione 43 związki poddano badaniom *in silico*, przeprowadzając dokowanie do struktury krystalicznej ludzkiej syntetazy arginylowej-tRNA (*ang.* arginyl-tRNA synthetase, ArgRS). Analizując energię wiązania do receptora oraz oddziaływania z miejscami wiążącymi receptora (w tym His 139, Asn 130, Asp 316, Try 312) Doktorant spośród wszystkich związków wyselekcjonował cztery pochodne, w tym trzy z pierwszej serii (**1a**, **1b**, **1c**) oraz jedną z serii drugiej (**2c**), a następnie podjął się zadania opracowania wydajnych metod ich otrzymania.

Mgr Grześkowiak założył, że dogodna strategia syntezy pochodnych **1a**, **1b** i **1c** zawierających w swojej strukturze pierścień 1,2,3-triazolowy uwzględniać będzie jako kluczowy etap reakcję Hüsgena azydoalaniny z odpowiednim alkinem. Przed przystąpieniem do syntezy docelowych związków Doktorant zajął się otrzymaniem azydozwiązku i odpowiednich alkinów stanowiących

tw. „bloki budulcowe”. W celu otrzymania azydoalaniny **17** Autor zamierzał wykorzystać jedną z opisanych procedur literaturowych albo ich modyfikację. Spośród dwóch dostępnych ścieżek syntetycznych zakładających wymianę grupy hydroksylowej w odpowiednio ochronionej L-serynie na funkcję azydową bezpośrednio w warunkach reakcji Mitsunobu, bądź alternatywnie uprzednie przekształcenie grupy hydroksylowej w dobrą grupę opuszczającą (mesyl), a następnie reakcję z azydkiem sodowym, Doktorant wybrał tę drugą, bezpieczniejszą do realizacji w warunkach laboratoryjnych. O ile otrzymanie pochodnej O-mesylowej L-seryny zrealizowane zostało efektywnie z bardzo dobrą wydajnością, to podczas otrzymania azydku **17** Doktorant napotkał na nieoczekiwane trudności. W tym miejscu podkreślić należy docieklivość i determinację jakimi mgr Grześkowiak wykazał się podczas rozwiązywania problemów syntetycznych. Autor nie poprzestał bowiem na próbach otrzymania związku **17**, ale podjął się zadania analizy składu złożonej mieszaniny poreakcyjnej, ustalił budowę głównego produktu powstającego w warunkach reakcji (pochodna oznaczona w pracy jako alken **18**), a następnie zaproponował alternatywną ścieżkę syntezy związku **17** uwzględniającą wykorzystanie odpowiednio ochronionej cyklicznej pochodnej L-seryny tj. w ditlenek 1,2,3-oksotiazolidynowy, którą następnie efektywnie potraktowano azydkiem sodowym otrzymując docelowy azydek **17**. Po otrzymaniu alkinów Doktorant przystąpił następnie do syntezy docelowych związków **1a–1c** wykorzystując otrzymane uprzednio azydoalaninę **17** i alkiny **5**, **6** i **7**. Również i w tym przypadku wykazał się kreatywnością optymalizując warunki reakcji cykloaddycji poprzez dobór efektywnego katalizatora miedziowego.

Kontynuując prace syntetyczne Doktorant przystąpił do otrzymania pochodnej **2a**, która z racji podobieństwa strukturalnego do argininy powinna wiązać się z receptorem w sposób najbardziej do niej zbliżony. Zaproponowana pięcioetapowa ścieżka syntetyczna uwzględniała użycie jako substratu handlowo dostępnej pochodnej estru cystyny, która w sekwencji reakcji redukcji do ochronionej cysteiny, reakcji Michaela z akrylonitrylem, reakcji Pinnera, przekształcenia pochodnej cyjankowej w amidynową i finalnie hydrolizy ochronionego estru aminokwasu w wolny aminokwas dała zaprojektowaną pochodną **2a**.

Biorąc pod uwagę doświadczalny charakter pracy wysoko należy ocenić część eksperymentalną pracy. Przedstawiono dokładny opis procedur syntetycznych uzupełniony o charakterystykę otrzymanych związków. Dowody strukturalne nie budzą wątpliwości. Na podkreślenie zasługuje fakt, że przedstawiona dokumentacja zawiera wydruki widm otrzymanych związków, które potwierdzają ich budowę i czystość. Świadczy to bardzo dobrze o technice pracy, dobrym przygotowaniu warsztatowym zarówno w zakresie syntezy organicznej jako i badań *in vitro* oraz dowodzi rzetelności naukowej.

Otrzymane pochodne, analogi argininy, poddano badaniom *in vitro*. Wykazano, że pochodne zawierające łącznik 1,2,3-triazolowy, należące do pierwszej serii tj. związki **1a-1c** nie są cytotoksyczne w stosunku do komórek U251MG w przeciwieństwie do pochodnej **2a**, która okazała się cytotoksyczna wobec badanych linii komórek nowotworowych U251MG oraz U87MG. Co więcej na podstawie uzyskanych wyników Autor sugeruje, że aktywność związku jest wynikiem zastępowania/naśladowania argininy w szlakach metabolicznych zależnych od argininy. Pomimo że badania aktywności biologicznej pochodnych należących do pierwszej serii (związki **1a-1c**) nie zakończyły się spektakularnym osiągnięciem, to dostarczyły ważnych informacji w zakresie zależności struktura-aktywność w grupie badanych pochodnych argininy. Pozytywnie należy ocenić podjętą przez Doktoranta próbę zaproponowania racjonalnego uzasadnienia obserwowanego braku aktywności ww. pochodnych z łącznikiem triazolowym **1a-1c**. Mgr Grześkowiak postuluje, że brak aktywności wobec badanych linii komórek nowotworowych może być wynikiem zawady sterycznej pierścienia 1,2,3-triazolowego albo wydłużenia odległości grup funkcyjnych w badanych cząsteczkach w porównaniu z arginina. Jak Doktorant słusznie podsumowuje, dalsze badania nad kolejnymi analogami dają szansę znalezienia odpowiedzi na powyższe wątpliwości. W tym miejscu, w świetle dotychczasowych obserwacji, prosiłabym o komentarz dotyczący tego, jakie kierunki modyfikacji struktury należałoby podjąć z zamiarem uzyskania pochodnej o wyżej aktywności.

Pozytywnie oceniam dyskusję wyników przedstawioną w osobnym rozdziale (*Discussion*). Doktorant w sposób syntetyczny odnosi się do uzyskanych wyników, wysuwa racjonalne wnioski i wskazuje kierunki badań jakie należy podjąć w rozwinięciu tematu. W rozdziale *Summary and conclusions* Doktorant w punktach podsumowuje najważniejsze osiągnięcia, choć w aspekcie podsumowania badań biologicznych ta część jest dość lakoniczna, Autor odnosi się tu bowiem jedynie do aktywnego związku **2a** pomijając wnioski z wyników badań *in vitro* uzyskanych dla pochodnych **1a-1c**.

Podsumowując prace badawcze przedstawione w rozprawie doktorskiej mgra inż. Piotra Grześkowiaka pragnę podkreślić, że zostały one zaplanowane racjonalnie, a poszczególne zadania konsekwentnie realizowane. Doktorant wykazał się umiejętnością stawiania hipotez badawczych, logicznego planowania prac eksperymentalnych, które następnie konsekwentnie realizował. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią bardzo dobrą podstawę do dalszych studiów w podjętej tematyce badawczej. Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji o interdyscyplinarnym charakterze, na podkreślenie zasługuje również to, że napisana została klarownym językiem, pomijając drobne niedociągnięcia edytorskie:

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

- str. 41: „*Every compound has been docked against the crystal structure of the human ArgRS (...)*” powinno być *docked into the crystal structure*;
- str. 57/Fig. 40: finalny związek to pochodna **1b**, a nie **1a**;
- str. 58/Fig. 42: zgodnie z opisem (str. 57) związek wyjściowy, pent-4-ynonitryl, to pochodna **27**, a nie **9**;
- str. 59: „*Deprotection of intermediate **36** (...)*” błędna numeracja związku – powinno być **35**;
- Str. 75: Autor wspomina, że z 43 zaprojektowanych związków podjął się syntezy i badań pięciu związków (**1a**, **1b**, **1c**, **1d** i **2a**) podczas gdy w rzeczywistości otrzymał i poddał ocenie aktywności biologicznej cztery związki (**1a**, **1b**, **1c** oraz **2a**);
- *List of Abbreviations* – w wykazie skrótów pominięto wyjaśnienia: IC<sub>50</sub>, ADP, GAPDH.

Mgr Piotr Grześkowiak ma w swoim dorobku 4 prace opublikowane w wysoko punktowanych czasopismach naukowych z listy JCR (*Bioorganic Chemistry, Frontiers in Microbiology, Journal of Power Source*), choć Doktorant nie jest w nich pierwszym autorem.

**Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca mgra inż. Piotra Grześkowiaka spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz.U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**