

dr hab. inż. Agnieszka Pladzyk, prof. PG
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
Katedra Chemii Nieorganicznej
email: agnieszka.pladzyk@pg.edu.pl
tel. +48 58 347 28 74

Gdańsk, 07.11.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Ciesielskiej pt.

„Synteza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych alkiloaminowych pochodnych sulfonamidowych: ocena oddziaływania z trójwartościowymi jonami metali oraz DNA, właściwości przeciwutleniające i cytotoksyczność”

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Ciesielskiej, przedstawiona do recenzji, została zrealizowana w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Mariusza Makowskiego oraz promotora pomocniczego dr Sandry Brzeskiej.

Ocena formalna

Rozprawa oparta jest na pięciu artykułach naukowych, które zostały opublikowane w latach 2021-2024 w renomowanych czasopismach z listy JCR, co odpowiada wymaganiam art. 13 ustawy „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki”. Prace są tematycznie spójne i stanowią podstawę dysertacji:

[P1]: S. Ramotowska, **A. Ciesielska**, M. Makowski: What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules* (2021) 26(11), 3478,

doi.org/10.3390/molecules26113478

[P2]: **A. Ciesielska**, M. Gawrońska, M. Makowski, S. Ramotowska: Sulfonamides differing in the alkylamino substituent length – synthesis, electrochemical characteristic, acid-base profile and complexation properties. *Polyhedron* (2022) 221, 115868 doi.org/10.1016/j.poly.2022.115868

[P3]: S. Ramotowska, P. Spisz, J. Brzeski, **A. Ciesielska**, M. Makowski: Application of the SwitchSense Technique for the Study of Small Molecules (Ethidium Bromide and Selected Sulfonamide Derivatives) Affinity to DNA in Real Time. *J. Phys. Chem. B* (2022) 126(38), 7238 ([doi:10.1021/acs.jpcc.2c03138](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c03138))

[P4]: J. Brzeski, **A. Ciesielska**, M. Makowski: Theoretical study of the alkylamino substituted sulfonamides with potential biological activity. *J. Phys. Chem. B* 2023, 127, 6620 ([doi:10.1021/acs.jpcc.3c05618](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.3c05618))

[P5]: **A. Ciesielska**, J. Brzeski, D. Zarzeczkańska, M. Stasiuk, M. Makowski, S. Brzeska: Exploring the interaction of biologically active compounds with DNA using the SwitchSense technique, UV-Vis spectroscopy, and computational methods. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* (2024) 316, 124313 ([doi:10.1016/j.saa.2024.124313](https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124313))

Autorka jest pierwszym autorem dwóch spośród opublikowanych artykułów, co potwierdza jej kluczowy wkład w badania. Sumaryczny wskaźnik wpływu tych publikacji w oparciu o bazę WoS wynosi 16,5 (IF pięcioletni: 16,1), a wartość punktowa w systemie MEiN wynosi 660. Prace cytowane były 42 razy, z czego 35 cytowań nie pochodzi od współautorów. Wskazane wskaźniki bibliometryczne sugerują, że temat podjęty przez mgr Aleksandrę Ciesielską wzbudza zainteresowanie w środowisku naukowym, a wyniki badań są uznawane za wartościowe.

Rozprawa ma strukturę typową dla tego rodzaju prac, obejmując streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów, wprowadzenie w tematykę badań, cele pracy oraz opis metod badawczych. Integralną częścią dysertacji są publikacje [P1]-[P5], które Autorka komentuje, prezentując koncepcje badań i analizę wyników. Całość wieńczy podsumowanie oraz obszerna bibliografia,

obejmująca 183 pozycje literatury z lat 1937-2024. Na końcu komentarza znajduje się zestawienie dotychczasowego dorobku naukowego mgr Aleksandry Ciesielskiej, dołączone są również oświadczenia współautorów publikacji, z których jednoznacznie wynika zakres prac i udział mgr Aleksandry Ciesielskiej w pracach stanowiących trzon rozprawy doktorskiej.

Całość rozprawy cechuje się estetycznym i czytelnym układem, a zarówno język, jak i zastosowane nazewnictwo chemiczne jest poprawne. Badania realizowane w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki OPUS nr UMO-2019/33/B/ST4/00031: *Synteza i właściwości biochemiczne pochodnych antybiotyków sulfonamidowych z analizą zmian profili bionieorganicznych wskutek kompleksowania z trójwartościowymi jonami metali (Ru, Rh, Os, Ir)* (kierownik projektu prof. dr hab. Mariusz Makowski), część zadań badawczych było finansowanych z Projektu służącemu Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Doktorantów realizowanego przez Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego oraz Projektu małych grantów – UGrants.

Moim zadaniem nie jest wprawdzie ocenianie całego dorobku naukowego mgr Aleksandry Ciesielskiej, a jedynie recenzja rozprawy doktorskiej Autorki, ale mimo wszystko w tym miejscu pragnę zaznaczyć, że wspomniany dorobek mgr Aleksandry Ciesielskiej jest zróżnicowany i obejmuje zarówno publikacje z listy *JCR* (9), liczne doniesienia konferencyjne krajowe i międzynarodowe (20), dwa zgłoszenia patentowe. Dodatkowo, Autorka odbyła dwa krótkie staże naukowe w zagranicznych ośrodkach naukowych.

Ocena merytoryczna

Rozprawa mgr Aleksandry Ciesielskiej podejmuje tematykę istotną z punktu widzenia współczesnych wyzwań, takich jak rosnąca oporność na leki oraz wzrost liczby zachorowań na nowotwory, które wymagają opracowywania nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwnowotworowym. W tej perspektywie praca stanowi istotny wkład w poszukiwanie innowacyjnych związków chemicznych o właściwościach terapeutycznych.

Autorka badała trzy nowe pochodne alkilosulfonamidów 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamidu, 4-amino-N-(2-aminopropilo)benzenosulfonamidu, 4-amino-N-(2-aminobutylo)benzenosulfonamidu, oznaczone odpowiednio jako NethylS, NpropylS oraz NbutylS, które różnią się długością podstawnika alkiloaminowego. Zsyntetyzowane związki scharakteryzowano pod kątem właściwości fizykochemicznych, w tym kwasowo-zasadowych, bakteriobójczych, przeciwtleniających, hydrofobowych oraz zdolności do wiązania z DNA i tworzenia kompleksów z jonami Rh(III) i Ru(III).

Wprowadzenie liczące 19 stron syntetycznie prezentuje kontekst badań, ze szczególnym uwzględnieniem problematyki lekooporności oraz potrzeby poszukiwania nowych związków aktywnych. Kolejny rozdział, *Cele badawcze pracy*, wyjaśnia cel główny, którym było zbadanie wpływu długości łańcucha alkiloaminowego na właściwości fizykochemiczne oraz aktywność biologiczną pochodnych sulfonamidowych. Rozdział dotyczący metod badawczych zawiera opis technik zastosowanych w pracy, takich woltamperometria cykliczna (CV) i pulsowa różnicowa (DPV), miareczkowanie spektrometryczne i potencjometryczne, spektrometria ^1H i ^{13}C NMR, UV-Vis, technika *SwitchSense* pozwalająca na badanie oddziaływań z DNA. Metody badawcze były realizowane przy współpracy z Pracownikami Katedry Ogólnej i Nieorganicznej Wydziału Chemii UG, Zakładu Badania Związków Biologicznie Czynnych UG, Pracowni Molekularnej i Komórkowej Nefrologii, Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Wskazanie, które z tych metod były realizowane bezpośrednio przez Autorkę, a które we współpracy z innymi zespołami, zwiększyłyby przejrzystość opisu.

Główna część rozprawy składa się z obszernego komentarza do publikacji [P1]-[P5], stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Każdy artykuł jest szczegółowo omówiony pod kątem wyników i metod. Przykładowo, publikacja [P1] przegląda techniki elektrochemiczne stosowane w badaniu interakcji DNA-lek. Publikacja [P3] opisuje zastosowanie techniki *SwitchSense* do określania szybkości asocjacji i

dysocjacji małych cząsteczek z DNA, umożliwiając pomiar parametrów kinetycznych, które są istotne dla oceny potencjalnej aktywności biologicznej pochodnych sulfonamidowych.

Rozdział *Podsumowanie*, zwięzły i syntetyczny, podkreśla wartość wyników Autorki, które wzbogacają wiedzę na temat wpływu struktury alkilosulfonamidów na ich właściwości chemiczne i biologiczne. Wprowadzenie i rozdziały dotyczące metod oraz opisu badań zawierają jednak pewne niedociągnięcia, które wymagają poprawy.

Poniżej zamieszczam krótką analizę zawartości publikacji stanowiących trzon rozprawy doktorskiej. Publikacja [P1] jest pracą przeglądową pozwalającą zapoznać się z aktualnym stanem wiedzy na temat dostępnych technik elektrochemicznych, ze szczególnym uwzględnieniem technik woltamperometrycznych, stosowanych do badania interakcji i ich siły wiązania między farmaceutykami a DNA, a także uszkodzeń spowodowanych przez biologicznie aktywne cząsteczki celujące w komórkowe DNA. Warto podkreślić, że metody elektrochemiczne są coraz częściej stosowane w tego rodzaju badaniach ze względu na ich wysoką czułość, prostotę procedury oraz niskie koszty. Metody te nie wymagają dużej liczby próbek do analizy, co jest szczególnie istotne w kontekście Zrównoważonego Rozwoju. Przygotowanie pracy przeglądowej umożliwiło Autorce określenie kierunku badań niezbędnych do realizacji tematu pracy doktorskiej.

W kolejnej pracy [P2] opisano syntezę i struktury, a także właściwości fizykochemiczne dwóch nowych pochodnych sulfonamidów 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamidu (NethylS), 4-amino-N-(2-aminopropyl)benzenosulfonamidu (NpropylS) różniących się długością podstawnika alkiloaminowego. Właściwości elektrochemiczne NethylS i NpropylS zbadano przy użyciu woltamperometrii cyklicznej (CV) i różnicowej woltamperometrii impulsowej (DPV) zarówno w rozpuszczalnikach wodnych i aprotycznych. Autorka określiła wpływ pH na procesy redoks NethylS/NpropylS i ich właściwości spektroskopowe, a wartości pK_a związków wyznaczyła przy użyciu kombinowanej metody pH-spektrofotometrycznego (mikro)miareczkowania. Dodatkowo, zdolność kompleksotwórczą otrzymanych pochodnych NethylS i NpropylS określono wobec jonów Ru(III) i Rh(III), razem ze stałymi trwałości otrzymanych kompleksów. Praca [P3] zawiera opis badań kolejnego etapu realizacji tematu, czyli kinetykę procesu wiązania się do DNA małych cząsteczek modelowych takich jak bromek etyldyny (EB), sulfatiazol (STZ) oraz pochodnych alkilosulfonamidów NethylS i NpropylS z użyciem techniki *SwitchSense*. Technika ta, w przeciwieństwie do np. woltamperometrii, pozwoliła określić zarówno szybkości wiązania (k) jak i stałe wiązania (K) molekuł do DNA. Badania przeprowadzono w trybie statycznym i dynamicznym w trzech różnych temperaturach 15, 25 i 37 °C. Porównanie uzyskanych wyników z wynikami dokowania dynamiki molekularnej przeprowadzonymi przez dr Jakuba Brzeskiego pokazały, że badane pochodne sulfonamidów NethylS i NpropylS wiążą się z helisą DNA dość wolno, ale za to tworzą addukty stabilne i względnie odporne na dysocjację wymuszoną przepływem buforu. Obecność odpowiednich grup w badanych związkach pozwoliła założyć, że w tym procesie ważną rolę mogą pełnić wiązania wodorowe utworzone pomiędzy badanymi cząsteczkami a DNA. Dzięki zastosowanemu modelowi teoretycznemu niekompletnej dysocjacji uzyskano dobre dopasowanie do punktów pomiarowych, a także wartości parametrów kinetycznych, które pokazują, że dla pochodnych NethylS i NpropylS można przeprowadzić badania właściwości biologicznych, mających na celu określenie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej.

Następstwem wcześniej przeprowadzonych badań były kolejne eksperymenty połączone z metodami obliczeniowymi, pozwalającymi określić budowę i właściwości fizykochemiczne kolejnych pochodnych sulfonamidów: 4-amino-N-(2-aminoetylo)benzenosulfonamidu (NethylS), 4-amino-N-(2-aminopropyl)benzenosulfonamidu (NpropylS), 4-amino-N-(2-aminobutyl)benzenosulfonamidu (NbutylS), 4-amino-N-(2-aminopentyl)benzenosulfonamidu (NpentylS), 4-amino-N-(2-aminohexyl)benzenosulfonamidu (NhexylS). Wyniki tych prac zostały opracowane w postaci publikacji [P4], do której mgr Aleksandra Ciesielska opracowała warunki syntezy pochodnej NbutylS, określiła jej strukturę, właściwości kwasowo-zasadowe, dla badanych związków wyznaczyła wartości pK_a

eksperymentalne i teoretyczne. Badania hydrofobowości analizowanych związków wykazały jej wzrost wraz z długością łańcucha podstawnika alkilowego. Przeprowadzone obliczenia termodynamiczne pokazały m.in., że za ten proces odpowiadają generowane wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe, uprzywilejowane termodynamicznie.

Ostatnia praca [P5] jest poświęcona określeniu powinowactwa wybranych cząsteczek: pirazyno-2-tiokarboksyamidu (PTCA), 1-(2-hydroksyetyloamino)-antraceno-9,10-dionu (AQ-NetOH) i 4-amino-N-(2-aminobutylo) benzenosulfonamidu (NbutylS) do wybranej sekwencji dwuniciowego DNA, a także określenie szybkości asocjacji i dysocjacji oraz stałych K dla adduktu cząsteczka-DNA. Autorzy pracy zaproponowali również model wiązania się badanych cząsteczek z DNA przy użyciu techniki *SwitchSense*, UV-Vis i metod obliczeniowych. Wyniki pokazały, że pochodna antrachinonu (AQ-NetOH) najszybciej wiąże się do DNA, aczkolwiek szybkość tworzenia adduktu zależy od temperatury. Addukt DNA z pochodną pirazyny PTCA charakteryzował się przyspieszoną dysocjacją w wyższych temperaturach, zaś addukt DNA z NbutylS wykazywał zwiększoną asocjację.

Kolejny rozdział (4.6.) prezentuje wyniki dotąd nieopublikowane, a wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Badania właściwości przeciwutleniających pochodnych NethylS oraz NpropylS względem rodników organicznych ABTS⁺ i DPPH[·]. Badania wykazały, że obie pochodne sulfonamidowe wykazują zdolność wygaszania ABTS⁺, która jest słabsza dla pochodnej zawierającej dłuższy łańcuch alkiloaminowy. Badania cytotoksyczności i właściwości antymikrobiologicznych pochodnych NethylS, NpropylS i NbutylS zostały przeprowadzone na komórkach HB2 i SKBr3n. Związki nie wykazują toksyczności względem zdrowych i nowotworowych komórek nabłonka piersi (HB2 i SKBr3), nie są też aktywne względem bakterii G(+) – *Staphylococcus aureus*, G(-) – *Escherichia coli* oraz drożdży *Candida albicans*.

Z całości przedstawionego materiału stwierdzam, że projekt badawczy mgr Aleksandry Ciesielskiej był przemyślany, rozsądnie zaplanowany i konsekwentnie realizowany z użyciem odpowiednio dobranych technik pozwalających określić właściwości badanych związków. Prace [P1]-[P5] opublikowane zostały w renomowanych czasopismach, zatem poddane były już szczegółowej ocenie merytorycznej. Z obowiązku recenzenta, ograniczę się jedynie do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Ciesielskiej, a uwagi i zapytania, które nasunęły mi się podczas jej lektury zamieszczam poniżej. Pragnę od razu podkreślić, że uwagi te nie umniejszają wartości naukowej pracy.

Rozdział Wprowadzenie

1. Rysunki zamieszczone w tym rozdziale są zbyt ogólne i nie wnoszą nowych informacji. Mogłyby zostać zastąpione bardziej szczegółowymi schematami ilustrującymi główne założenia badań.
2. W tekście brakuje cytowania nr 71
3. Tabela 1 to zestawienie zarówno grup antybiotyków i chemioterapeutyków, zatem jej tytuł jest niewłaściwy - sulfonamidy np. nie są antybiotykami.
4. str. 24 – informacja zawarta w tabeli, w drugiej kolumnie - w przypadku tetracyklin – czy chodzi o pierścienie węglowodanowe czy węglowodorowe?
5. str. 28 – Co to jest wodór dwuwodorotlenowy?
6. str. 30 – w pierwszym wersie Autorka przytacza związki z grupy sulfonamidów stosowane w medycynie i weterynarii – w moim odczuciu zamieszczenie wzorów związków pozwoliłoby czytelnikowi na lepsze zrozumienie zależności strukturalnych i wykazywanych aktywności.
7. str. 30 – zdania typu „W konsekwencji, występowanie ugrupowań sulfonamidowych cieszy się dużą popularnością...” należy sformułować precyzyjniej, aby uniknąć niejasności.
8. str. 31 – uważam, że fragment „Metalami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu są m.in. sód (Na), potas (K), magnez (Mg), wapń (Ca), wanad (V), chrom (Cr), mangan (Mn), żelazo (Fe), kobalt (Co), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), molibden (Mo) i kadm (Cd) [100–102]. W komórkach jony metali występują głównie w postaci związków koordynacyjnych, na przykład atomem centralnym

chlorofilu A jest jon Mg^{2+} , witaminy B12 – Co^{+} , a hemu – Fe^{2+} .” jest zbędny. Jeśli jednak idzie za nim konkretny przekaz, to prosiłabym Autorkę o jego wskazanie.

9. str. 31 – w moim odczuciu cisplatyna jest nadal fenomenalnym odkryciem, także pozwolę sobie nie zgodzić się ze stwierdzeniem, że jest jedynie „Innym, popularnym związkiem koordynacyjnym...”
10. str. 33 – zawiera skróty myślowe i niefortunne sformułowania, jak np. „W literaturze brakuje jednak kompleksowego przeglądu typów ich budowy ze względu na niską wydajność syntezy oraz słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych.”, „kierowanie działania w mitochondria”, „aby uzyskać znaczące efekty przeciwnowotworowe”.
11. strony 33 – 34 – fragment „Podsumowując, w związku rozpowszechniającym się problemem lekooporności i chorób nowotworowych konieczne jest poszukiwanie leków o większym spektrum działania biologicznego. Pochodne sulfonamidowe stanowią ciekawą ścieżkę badań ze względu na mnogość aktywności jakie wykazują. Na uwagę zasługuje również chemia koordynacyjna trójwartościowych jonów rutenu i rodu. Badania dotyczące powyższych związków są alternatywą dla konwencjonalnych terapii. Uzyskane informacje pozwolą na zaproponowanie nowych struktur substancji o właściwościach terapeutycznych.” wymaga poprawy. Autorka porusza tak dużo różnych wątków w postaci haseł, że czytając ten fragment odnosi się wrażenie o jego niespójności.

Rozdział Cele badawcze pracy

1. W pracy brakuje wyjaśnienia, dlaczego wybrano właśnie te trzy pochodne alkilosulfonamidowe do badań nad interakcjami z DNA. Uzasadnienie tego wyboru wzbogaciłoby wartość naukową rozprawy.
2. str. 36 – rysunek 7 – w podpisie do rysunku powinna być informacja o tym, które kolory przedstawiają poszczególne atomy. Można było w tym miejscu umieścić na przykład wzory strukturalne związków.

Rozdział Opis stosowanych metod badawczych

Warto wyraźnie zaznaczyć, które z opisanych metod Autorka stosowała samodzielnie, a które były realizowane we współpracy, co umożliwi pełniejszą ocenę jej umiejętności praktycznych.

Rozdział Przedmiot badań oraz komentarz

W każdym z podrozdziałów dotyczących poszczególnych publikacji dobrze byłoby zamieścić informację na temat osobistego wkładu Autorki w dane badania. Dodatkowo, w niektórych fragmentach tego rozdziału zauważalny jest wpływ stwierdzeń zawartych w poszczególnych publikacjach.

Pozostałe uwagi:

1. str. 52 – w zdaniu „Środowisko wodne występuje w organizmie prawie we wszystkich molekułach.” należy doprecyzować, co Autorka miała na myśli.
2. str. 57 – „W przypadku badanych ligandów atomami donorowymi, które mogą brać udział w kompleksowaniu jonów metali, są atomy azotu (głównie N2 i N3, rzadziej N1) (Rysunek 7) i ewentualnie atom tlenu grupy $-SO_2NH-$...” – na wspomnianym rysunku brakuje oznaczeń atomów przytoczonych w tym fragmencie.
3. str. 59 – „...a termodynamiczna charakterystyka wiązania z tą biomolekułą została dobrze opisana z wykorzystaniem innych eksperymentów [161,162].” – takie stwierdzenie wymaga przytoczenia przynajmniej jednego „eksperymentu”
4. str. 68 – „W celu poszerzenia doświadczenia badania rozpoczęto od syntezy związku NbutylS, a następnie potwierdzono jego strukturę.” – proszę o informację w jaki sposób struktura tej pochodnej została określona.
5. str. 73 – „Ponadto mogą mieć odniesienie na właściwości kompleksujące omawianych sulfonamidów z biologicznie istotnymi jonami metali, których połączenia znajdują zastosowanie także w farmaceutykach.” – bardzo proszę chociaż o jeden przykład.
6. str. 73 – „Specyficzna hydrofobowość związków sugeruje, czy są one w stanie przenikać przez błony biologiczne, a także czy będą wydalane przez nerki. Jest to bardzo ważny aspekt brany pod uwagę przy projektowaniu nowych leków, ponieważ podróż cząsteczki leku z miejsca podania do miejsca

działania jest złożona i wiąże się z wieloma zmianami w środowisku.” – ten fragment powinien być poprawiony.

Podsumowanie

Podjęta przez mgr Aleksandrę Ciesielską tematyka jest aktualna i ważna w kontekście poszukiwań nowych związków o potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych. Wyniki badań Autorki poszerzają wiedzę na temat właściwości fizykochemicznych i biologicznych pochodnych sulfonamidowych, przyczyniając się do rozwoju chemii koordynacyjnej oraz badań nad oddziaływaniami z DNA.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. **„Synteza, właściwości fizykochemiczne i biologiczne wybranych alkiloaminowych pochodnych sulfonamidowych: ocena oddziaływania z trójwartościowymi jonami metali oraz DNA, właściwości przeciwutleniające i cytotoksyczność”** spełnia wymogi formalne stawiane pracom doktorskim, określone Ustawą z dnia 20 lipca 2018 – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Aleksandry Ciesielskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

