

Wydział Farmaceutyczny  
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
dr hab. n. farm. Iwona Elżbieta Głowacka, prof. uczelni

Łódź, 8 maja 2023 r.

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Anny Sochackiej-Ćwikła  
pt. „*Synteza nowych pochodnych 5-aminooksazolo-4-karbonitrylu  
i oksazolo[5,4-d]pirymidyny o potencjalnej aktywności biologicznej*”**

**przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego  
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w celu uzyskania stopnia doktora, w dziedzinie  
 nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej i Technologii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem dra hab. Marcina Mączyńskiego, prof. uczelni oraz dra Andrzeja Regieca pełniącego rolę promotora pomocniczego.

Łączenie kilku fragmentów farmakoforowych w obrębie jednej struktury należy obecnie do powszechnie stosowanych strategii w projektowaniu nowych połączeń o żądanych właściwościach zarówno fizykochemicznych jak i farmakologicznych. Intensywnie badaną grupą są związki hybrydowe zawierające w strukturze układ triazolu, izoksazolu czy oksazolu. Zainteresowanie tego typu połączeniami wynika z ich wielokierunkowej aktywności biologicznej, a co za tym idzie stanowią one przedmiot szeregu modyfikacji strukturalnych. W Zespole Promotora od lat prowadzone są intensywne badania dotyczące syntezy oraz oceny aktywności biologicznej związków z grupy izoksazoli oraz oksazoli. Przedstawione przez mgr Aleksandrę Sochacką-Ćwikła wyniki wpisują się w tematykę Zakładu i stanowią konsekwentną kontynuację wysoce aktualnego nurtu badań.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi spójny tematycznie cykl 4 współautorskich prac (2 prace oryginalne i 2 prace przeglądowe), opublikowanych w latach 2020–2022 i została podzielona na dwie zasadnicze części. Pierwsza część obejmuje 46 stronicowe opracowanie zawierające wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wykaz stosowanych skrótów, wstęp wprowadzający w podjętą tematykę, cele badawcze, hipotezy badawcze, opis metodologii badań, omówienie publikacji składających się na cykl będący podstawą rozprawy wraz z dyskusją, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa. W skład drugiej części rozprawy wchodzi cztery artykuły naukowe wraz z dołączonymi materiałami uzupełniającymi stanowiące podstawę dysertacji, w których Doktorantka jest pierwszym autorem, a w trzech również autorem korespondencyjnym (dwie prace opublikowane w *Molecules*, jedna praca w *Cancers*, i jedna praca w *International Journal of Molecular of Sciences*; sumaryczny IF=22,637, 560 pkt. MNiSW). Całość uzupełnia ogólna charakterystyka dorobku Doktorantki z podkreśleniem jej osiągnięć naukowych i dydaktycznych oraz oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału we wspólnych interdyscyplinarnych

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej  
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1  
tel. (042) 677 92 37  
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl  
www.umed.pl

pracach, które nie pozostawiają wątpliwości co do dominującego udziału Doktorantki w wykonaniu badań, opracowaniu i interpretacji wyników. Należy podkreślić, że na całkowity dorobek Doktorantki składa się łącznie 9 prac oryginalnych, 1 przyznany patent oraz doniesienia i komunikaty (17) zaprezentowane na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Pani mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła była kierownikiem w 3 i wykonawcą w 5 projektach badawczych, w tym jednego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Doktorantka odbyła dwa trzymiesięczne staże naukowe, jeden w ramach projektu *Staż Sukcesem Naukowca* i drugi zagraniczny w Complutense University of Madrid, Hiszpania. Ponadto mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła jest współautorką skryptu dla studentów kierunku farmacja. W dokumentacji znalazły się również dane dotyczące otrzymanych nagród, wykaz odbytych szkoleń i działań popularyzujących naukę, jak również szczegółowe dane bibliometryczne takie jak współczynniki oddziaływania (sumaryczny IF=46,753; punktacja MNiSW=779 pkt.), liczba cytowań prac Doktorantki (80 bez autocytowań) oraz wartość indeksu Hirscha (H=5). Są to bardzo dobre parametry, jak na ten etap kariery naukowej. Mgr Aleksandra Sochacka-Ćwikła jest również laureatką dwóch zespołowych Nagród Rektora oraz stypendystką z projektów *Staż Sukcesem Naukowca* oraz *Program Rozwoju Akademii Medycznej we Wrocławiu*.

Przed przystąpieniem do oceny wyników uzyskanych przez mgr Aleksandrę Sochacką-Ćwikła należy podkreślić, że zostały one już opublikowane w czasopiśmie z tzw. Listy Filadelfijskiej i merytorycznie ocenione przez niezależnych recenzentów. Moje zadanie jako recenzentki sprowadza się zatem do oceny zakresu i tematyki prowadzonych badań. W niniejszej recenzji skoncentruję się przede wszystkim na merytorycznej ocenie wstępu teoretycznego oraz komentarzy do publikacji, bowiem ta część jest autorskim opracowaniem Doktorantki, które pokazuje zasób Jej wiedzy, umiejętność formułowania wniosków oraz posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

W pierwszej części autoreferatu mgr Sochacka-Ćwikła wprowadza Czytelnika w realizowaną tematykę wykazując jej aktualność potwierdzoną danymi literaturowymi co jednoznacznie potwierdza, że Doktorantka potrafi pozyskiwać niezbędne informacje i krytycznie je analizować. W kolejnych dwóch rozdziałach zatytułowanych „Cele badawcze” i „Hipotezy badawcze” Autorka w przejrzysty sposób przedstawiła cele pracy wraz z zakresem prowadzonych badań oraz prawidłowo zdefiniowała hipotezy badawcze. W rozdziale „Metodologia badań” mgr Sochacka-Ćwikła skrupulatnie opisała poszczególne etapy syntezy związków oznaczonych w pracy jako **S1**, **S2** i **S3** oraz dwóch serii pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyn (związki **serii P1** i **P4**), jak również techniki jakimi się posługiwała w celu określenia ich czystości i potwierdzenia struktury. Następnie jasno nakreśliła cele przeprowadzonych prac zarówno teoretycznych, jak i badań biologicznych *in vitro*. Dodatkowo Autorka podała gdzie i przez kogo badania te były wykonywane.

Rozdział „Omówienie publikacji składających się na cykl będący podstawą rozprawy” stanowi rdzeń przedstawionej pracy, w którym Autorka opisuje oraz analizuje wyniki badań wspierając się materiałami opublikowanymi. Niewątpliwie punktem wyjścia do podjętych badań były tu wcześniejsze dokonania i osiągnięcia zespołu Promotora. W tej części Autorka przeprowadza czytelnika przez kolejne etapy badań, koncentrując się w głównej mierze na wynikach badań biologicznych, co jest w pełni uzasadnionym podejściem gdyż całościową ścieżkę syntetyczną zaprezentowała w rozdziale „Metodologia badań”. Zakres przeprowadzonych badań był szeroki, w związku z tym bardzo trudno jest je skrótowo podsumować. Nie taki jest zresztą

cel recenzji, tym bardziej, że Autorka bardzo zwięźle opisała to w rozdziale „Podsumowanie i wnioski”. Ograniczę się zatem do wymienienia osiągnięć, które uważam za najważniejsze.

W pierwszej publikacji **P1** opisano metodę syntezy dwóch pochodnych 5-aminooksazolo-4-karbonitrylu **S1** i **S2** oraz 12 pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny (**SCM1-12**), jak również wyniki badań aktywności immunologicznej, przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej przeprowadzonych dla wybranych 10 pochodnych (**SCM1-10**). W serii otrzymanych pochodnych najlepsze działanie przeciwwirusowe względem komórek A549 zainfekowanych wirusem HHV-1 wykazywały związki **SCM5** i **SCM9**, które odznaczały się również niską toksycznością oraz posiadały obiecujący profil immunoregulacyjny. Dodatkowo związek **SCM9** był cytotoksyczny względem komórek HT29. Na podstawie przeprowadzonej wstępnej analizy SAR mgr Sochacka-Ćwikła wykazała, że aktywność biologiczna zależy od rodzaju podstawnika na atomie azotu w pozycji 7. Związki **serii P1** o najlepszym profilu farmakologicznym tj. **SCM5** i **SCM9** posiadały na atomie azotu w pozycji 7 podstawnik lipofilowy o długości pięciu liniowo ułożonych atomów, tj. odpowiednio pentylowy i (*N,N*-dimetyloamino)propylowy. Dopełnieniem tej części było przedstawianie prawdopodobnego mechanizmu działania związków **SCM5** i **SCM9**, który związany jest z aktywnością proapoptotyczną. Analiza wyników badań biologicznych pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny pierwszej serii **SCM1-10**, a w szczególności aktywności cytotoksycznej względem wybranych linii nowotworowych, zainspirowała Autorkę do przeglądu literatury obejmującego związki o działaniu przeciwnowotworowym zatwierdzone przez FDA do leczenia po 2010 roku. W publikacjach **P2** i **P3** Autorka opisała ostatnie trendy i postępy w projektowaniu leków stosowanych w leczeniu nowotworów złośliwych, odpowiednio hematologicznych oraz guzów litych. Analiza doniesień literaturowych pod tym kątem jest niezwykle cenna i ma istotne znaczenie w kontekście dalszego opracowywania bardziej specyficznych, celowanych środków opartych na strukturze oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny. Mgr Sochacka-Ćwikła przeanalizowała wprowadzone leki, m.in. pod kątem ich struktury oraz mechanizmu działania opisując przy tym szczegółowo specyficzne dla nich cele molekularne, co w konsekwencji pozwoliło na określenie cech wpływających na ich większą skuteczność działania i mniejszą toksyczność. Autorka zwróciła uwagę, że wszystkie opisane związki małowcząsteczkowe były układami aromatycznymi i tylko poza dwoma wyjątkami zawierały w swojej strukturze układ heterocykliczny. W czwartej pracy **P4** opisano metodę syntezy pochodnej 5-aminooksazolo-4-karbonitrylu **S3** oraz 10-ciu finalnych pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny **seria P4 (3a-j)**. Związki **3a-j** poddano badaniom *in vitro* pod kątem ich aktywności cytotoksycznej wobec czterech ludzkich linii nowotworowych (A549, MCF7, LoVo i HT29) oraz dwóch prawidłowych linii komórkowych (L929 i NHDF). Zbadano również zdolność pochodnych do hamowania glikoproteiny P oraz ich aktywność proapoptotyczną. Dla związku **3g**, który wykazywał najwyższą aktywność cytotoksyczną i proapoptotyczną przeprowadzono dodatkowo analizę mechanizmu działania. Wykazano, że hamuje on migrację komórek HT29 oraz indukuje ich śmierć poprzez zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy (niski poziom białka BCL-2 oraz wysoki poziom kaspazy 3). Dopełnieniem badań była analiza *in silico* wybranych pięciu pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny **serii P4** oraz związku **SCM 9** (z serii P1) przeprowadzona pod kątem określenia ich oddziaływania z VEGFR2 w odniesieniu do tiwozanibu. W serii badanych związków pochodna **3g** okazała się najsilniejszym z zaprojektowanych inhibitorów. Analiza struktura-aktywność pozwoliła na określenie głównych fragmentów farmakoforowych istotnych dla oddziaływań z poszczególnymi regionami VEGFR2 w tej klasie związków. Natomiast wyniki dokowania molekularnego wykazały, że w przeciwieństwie do tiwozanibu, pierścień izoksazolu

w zsyntetyzowanych związkach stanowi ugrupowanie wiążące się z regionem zawiasowym receptora.

W toku badań mgr Sochacka-Ćwikła opracowała i zoptymalizowała metodę syntezy odpowiednio sfunkcjonalizowanych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyn. W sumie Doktorantka otrzymała 27 nowych związków heterocyklicznych, których strukturę oraz czystość chemiczną potwierdziła metodami spektroskopowymi IR, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR oraz MS. Ponadto w celu potwierdzenia struktury związków **serii P1**, w przypadku których jest możliwość wystąpienia tautomerii aminowo-iminowej, dla pochodnej **SCM8** przeprowadzono dodatkowo analizę rentgenostrukturalną monokryształu udowadniając jednoznacznie strukturę aminową. Należy również podkreślić, że Doktorantka w swojej pracy wykorzystuje proste dwu- i trój etapowe procedury syntezy nowych połączeń, co z punktu widzenia chemii medycznej ma duże znaczenie. Uzyskane przez mgr Sochacką-Ćwikła wyniki potwierdziły wysoki potencjał pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyn jako związków o działaniu przeciwnowotworowym, jednocześnie wskazując dalsze kierunki poszukiwań w tej grupie połączeń.

Warto podkreślić, że dokonane przez Doktorantkę podsumowanie wyników badań własnych stanowi inspirację do dalszych modyfikacji strukturalnych, co w połączeniu z uzyskanymi obiecującymi wynikami daje podstawę do kontynuowania badań nad projektowaniem nowych pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny z wykorzystaniem modelowania molekularnego oraz metod obliczeniowych, mogących prowadzić do uzyskania kolejnych serii związków o lepszym działaniu biologicznym. Doktorantka wskazuje na możliwość dalszej funkcjonalizacji pochodnych 5-aminooksazolo-4-karbonitrylu w pozycjach 2 i 5, jak również pochodnych oksazolo[5,4-*d*]pirymidyny w pozycjach 2, 5 i 7. Zatem wprowadzenie we wskazanych pozycjach odpowiednich podstawników, określonych na podstawie porównania wyników badań *in vitro* z danymi modelowania molekularnego, pozwoli na poszukiwanie i syntezę kolejnych inhibitorów VEGFR2.

Podsumowując część autoreferatową należy podkreślić, że została ona napisana bardzo starannie i poprawnym językiem. Z obowiązku recenzenta muszę jedynie wspomnieć, że Autorce nie udało się uniknąć drobnych błędów literowych. W mojej ocenie jedynym minusem, który utrudnia czytanie jest brak wyszczególnienia podstawników na atomie azotu w finalnych związkach przedstawionych na schemacie 2. Analizując wyniki czytelnik zmuszony jest do korelowania ich z danymi zawartymi w oryginalnych pracach. Nie do końca jest dla mnie jasne jakimi kryteriami kierowała się Autorka przy wyborze odpowiednich podstawników?

Przedstawiona rozprawa zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Zarówno zaplanowany tok badań, jak i analiza wyników oraz umiejętność wyciągania wniosków świadczą o dojrzałości naukowej mgr Aleksandry Sochackiej-Ćwikła. Należy podkreślić, że ustalając budowę chemiczną nowo zsyntetyzowanych połączeń Doktorantka wykazała się biegłością w interpretacji widm NMR i wykorzystywaniu danych spektralnych w analizie strukturalnej. Komplet widm (Supplementary Information do załączonych publikacji) potwierdza wysoką czystość otrzymanych związków i bardzo dobrze świadczy o technice pracy Doktorantki i jej doskonałym przygotowaniu warsztatowym. Na podkreślenie zasługuje również interdyscyplinarny charakter prezentowanej pracy, wynikający z połączenia syntezy organicznej z szerokim zakresem badań biologicznych wykonanych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, Katedrze i Zakładzie Farmakologii



Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Katedrze Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W mojej ocenie wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdzają zasadność podjętej tematyki badawczej, mają dużą wartość naukową i mogą w przyszłości przyczynić się do rozwiązania ważnych problemów współczesnej farmakoterapii. Dotychczasowe osiągnięcia Doktorantki wskazują, że jest ona naukowcem o wysokim potencjale dalszego rozwoju.

**Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Anny Sochackiej-Ćwikła spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Iwona Głowacka*