RN - BF 4100.6.2021
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RDN 6518 2024
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis Feralewska 17.04.2024

UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

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

Łódź 17 kwiecień 2024

Recenzja pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Anny Strzeleckiej zatytułowanej

***„Synteza i ocena potencjału przeciwnowotworowego nowych 1,3,4-oksadiazolowych oraz 1,2,4-triazolowych pochodnych 4,6-diemtylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu"* przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem dra hab. Piotra Świątka, profesora uczelni, którego tematyka badawcza koncentruje się wokół zagadnień związanych z projektowaniem, syntezą i oceną właściwości biologicznych pochodnych wybranych związków heterocyklicznych, w tym 4,6-dimetyloizotiazolo[5,4-*b*]pirydyny, a także 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa mgr Małgorzaty Strzeleckiej jest odpowiedzią na wciąż rosnące zapotrzebowanie na opracowania nowych, skutecznych chemioterapeutyków. Strategia łączenia odpowiednich fragmentów farmakoforowych w celu otrzymania nowych połączeń hybrydowych o wyższej aktywności biologicznej jest jednym z powszechnie stosowanych podjeść w chemii medycznej zmierzających do otrzymania nowych związków o korzystnym profilu terapeutycznym. Zadaniem badawczym jakiego podjęła się Doktorantka było zaprojektowanie i synteza 3 serii nowych połączeń zawierających pierścień 1,3,4-oksadiazolu albo 1,2,4-triazolu oraz odpowiednie ugrupowania farmakoforowe tj. ugrupowanie N-acylohydrazonowe, aminometylowe i azometinowe.

Dysertacja przygotowana została w formie komentarza do spójnego cyklu trzech tematycznie powiązanych wieloautorskich artykułów opublikowanych w renomowanych wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR (dwie prace w *International Journal of Molecular Sciences* oraz jedna w *Bioorganic Chemistry*). W świetle oświadczeń współautorów i deklarowanego udziału samej Doktorantki w powstanie wyżej wymienionych prac, zastosowanie takiej formy rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadnione. Z przedstawionej dokumentacji jednoznacznie wynika bowiem, że Doktorantka odegrała

wiodącą rolę w powstaniu koncepcji przedstawionych badań, w opracowaniu metod syntezy zaprojektowanych związków, potwierdzeniu ich budowy i czystości, brała również udział w interpretacji wyników badań biologicznych. Wartym podkreślenia jest fakt istotnego wkładu Doktorantki w przygotowanie manuskryptów; w dwóch pracach mgr Strzelecka jest pierwszym autorem, a w jednej pełni również rolę współautora korespondującego.

Opis prac własnych poprzedzony został krótkim wprowadzeniem, w którym Doktorantka w sposób zwięzły ujęła problemy i ograniczenia dostępnych terapii nowotworowych. W celu wykazania celowości podjętego kierunku poszukiwań aktywnych związków pokazano struktury dostępnych na rynku farmaceutycznym chemioterapeutyków bazujących na strukturze 1,3,4-oksadiazolu i 1,2,4-triazolu. W syntetycznej formie przedstawiono również dotychczasowe osiągnięcia macierzystego zespołu w badaniach nad syntezą N-acylohydrazonowych pochodnych 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu i ich aktywnością inhibicyjną wobec cyklooksygenazy oraz cytotoksycznością wobec testowanych komórek nowotworowych. W przedstawionym ujęciu badania podjęte przez Doktorantkę stanowią twórcze rozwinięcie badań prowadzonych w zespole Promotora.

Cel i zakres pracy zostały jednoznacznie zdefiniowane, a poszczególne cele badawcze racjonalnie zaplanowane. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań obejmujących syntezę zaprojektowanych związków i ocenę ich potencjału biologicznego. Wyniki prac badawczych Doktorantka opisała w kolejnych rozdziałach, które skorelowane zostały z wynikami opublikowanymi w odpowiednich publikacjach (publikacje **P1–P3**).

Koncepcję modyfikacji struktury związku macierzystego tj. 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu przedstawiono w bardzo przejrzysty sposób na rysunku 4 (str. 15). Zaprojektowano 3 serie związków, dwie zawierające w swojej strukturze pierścień 1,3,4-okasadiazolu (seria **I** i **II**, publikacje **P1–P2**) i jedną z fragmentem 1,2,4-triazolowym (seria **III**, publikacja **P3**). Doktorantka założyła, że zwiększenie efektu cytotoksycznego będzie możliwe poprzez dodatkową funkcjonalizację odpowiednimi ugrupowaniami farmakoforowymi, w tym N-acylohydrazonowym, aminometylowym i azometinowym. Wśród głównych zadań badawczych uwzględniono ocenę aktywności cytotoksycznej, ocenę zdolności hamowania i powinowactwa pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych do izoform cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2). Założono, że najaktywniejsze pochodne wyselekcjonowane zostaną do poszerzonych badań *in vitro* i *in silico* z zamiarem podjęcia prób wyjaśnienia mechanizmu działania.

Łącznie otrzymano 33 nowe pochodne (9 związków w serii **I**, 10 pochodnych w serii **II** oraz 14 w serii **III**), co wymagało opracowania wieloetapowych ścieżek syntetycznych. Do syntezy wszystkich zaprojektowanych związków wykorzystano jako substrat *N*-(2-hydrazynylo-2-oksoetylo)-4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamid, a dalsze przekształcenia obejmowały konstrukcję centralnego układu

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

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

1,3,4-oksadiazolowego (seria **I** i **II**) albo 1,2,4-triazolowego (seria **III**), a następnie ich dalszą odpowiednią funkcjonalizację w obrębie utworzonych pierścieni heterocyklicznych tj. wprowadzenie ugrupowań N-acylohydrazonowych (seria **I**), zainstalowanie poprzez łącznik metylenowy ugrupowania morfolinowego albo podstawionych piperazyn (seria **II**) i wreszcie wprowadzenia funkcji iminowej do pierścienia 1,2,4-triazolowego poprzez kondensację pierwszorzędowej funkcji aminowej przy N4 w 1,2,4-triazolu z odpowiednimi (hetero)aromatycznymi aldehydami (seria **III**). Z zadania opracowania dogodnych metod syntezy zaprojektowanych związków Doktorantka wywiązała się znakomicie. Przedstawione zostały jednoznaczne dowody strukturalne. Mgr Małgorzata Strzelecka udowodniła, że doskonale opanowała warsztat syntetyczny, swobodnie posługuje się również nowoczesnymi metodami identyfikacji związków organicznych o złożonej strukturze. Do przedstawionej do oceny dokumentacji oprócz wydruków publikacji dołączono materiały uzupełniające (*Supplementary Materials*) zawierając wydruki widm otrzymanych związków, które potwierdzają ich budowę i czystość. Świadczy to o dobrym opanowaniu techniki pracy i dowodzi rzetelności naukowej.

W ramach badań nad pierwszą serią pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych (publikacja **P1**) dokonano optymalnego wyboru podstawników w obrębie ugrupowania N-acylohydrazonowego. Analizując budowę finalnych związków Doktorantka zmierzyła się z problemem izomerii w obrębie ugrupowania amidowego i podwójnego wiązania C=N fragmentu hydrazonowego. Wszystkie otrzymane pochodne z tej serii poddano badaniu zdolności do hamowania cyklooksygenazy oraz sposobu wiązania się z centrum aktywnym enzymu. Największym osiągnięciem tej części projektu było wyselekcjonowanie związku odznaczającego się największą zdolnością do hamowania obu izoform COX-1 i COX-2 (pochodna oznaczona w pracy **P1** jako **13**), wyższą od użytych leków referencyjnych tj. piroksykamu i meloksykamu. Co więcej udowodniono selektywne działanie trzech pochodnych (związki **5**, **11** i **12**) względem izoformy COX-1, ponownie wyższe niż leki referencyjne. Przeprowadzone badania *in silico* sugerują, że związek **11** wykazuje największe powinowactwo do kieszeni wiążącej COX-1 i COX-2. W dalszym rozwinięciu oceniono aktywność cytotoksyczną badanej serii związków wobec czterech linii komórek nowotworowych (A549, MCF-7, LoVo, LoVo/Dx) oraz trzech linii komórek prawidłowych (NHDF, VERO, V79). Wykazano wysoką wrażliwość linii komórek LoVo na badane związki (IC_{50} = 2.89±0.89 – 4.34±0.56 μM). W tym miejscu należy podkreślić wysoki indeks terapeutyczny względem komórek prawidłowych (IS = 13 – 20).

Kontynuując prace nad sfunkcjonalizowanymi pochodnymi 1,3,4-oksadiazolowymi otrzymano kolejną serię związków (pochodnych o charakterze zasad Mannicha), poprzez łącznik metylenowy wprowadzając do pierścienia 1,3,4-oksadiazolo-2-tionu morfolinę albo odpowiednio podstawioną piperazynę (publikacja **P2**). Badania nad tą częścią projektu zaowocowały otrzymaniem kolejnych 10 pochodnych, które zbadano pod kątem określenia ich potencjału cytotoksycznego względem pięciu linii ludzkich komórek nowotworowych (A375, C32, SNB-19, MCF-7/WT i MCF-7/Dx). Wyselekcjonowano dwie najaktywniejsze

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

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

pochodne (związki **5** i **6**, publikacja **P2**) i potwierdzono niższą cytotoksyczność związku **6** w stosunku do komórek prawidłowych (linia HaCaT), w porównaniu z pochodną **5**. W dalszym rozwinięciu badań *in vitro* na liniach komórek nowotworowych C32 i A375 wykazano, że związki **5** i **6** działają proapoptotycznie, a także zaburzają strukturę cytoszkieletu aktynowego badanych komórek.

Logicznym rozwinięciem prowadzonych prac syntetycznych było zaprojektowanie kolejnych serii związków poprzez wprowadzenie innego ugrupowania heterocyklicznego w miejsce 1,3,4-oksadiazolu. Doktorantka zdecydowała się otrzymać pochodne z ugrupowaniem 1,2,4-triazolowym (publikacja **P3**). W ramach tej serii zsyntezowano 14 finalnych pochodnych, które poddano badaniom aktywności cytotoksycznej względem wybranych linii komórek nowotworowych (linia komórkowa raka żołądka EPG, linie komórkowe raka jelita grubego HT29, LoVo i LOVo/Dx) oraz linii komórek prawidłowych (CCD 841 CoN). Ważnym osiągnięciem tej części badań było wykazanie działania cytotoksycznego związku **4h** wobec komórek raka żołądka (IC_{50} = 12.10±3.10 μM) oraz związków **4d**, **4e** i **4l** wobec linii komórkowych rak jelita grubego (IC_{50} = 52.80±4.20 – 84.60±4.00 μM); jednocześnie potwierdzono korzystniejszy profil bezpieczeństwa w porównaniu z lekami referencyjnymi. W rozwinięciu prowadzonych badań biologicznych oceniono wpływ wybranych związków (**4d**, **4e** i **4l**) na czynność transportową glikoproteiny P (P-gp) w komórkach raka jelita grubego linii Ht-29, LoVo i LoVo/Dx oraz przeprowadzono badania właściwości proapoptotycznych. Uzyskane wyniki pozwoliły Autorce wnioskować, że działanie cytotoksyczne prawdopodobnie zachodzi na drodze apoptozy indukowanej hamowaniem P-gp oraz zwiększonym stężeniem kaspazy-3 oraz białka p53 w komórkach zmienionych nowotworowo.

Pozytywnie oceniam podsumowanie wyników przedstawione w sposób syntetyczny w rozdziale *PODSUMOWANIE I WNIOSKI*. Doktorantka w zwięzły sposób odnosi się do uzyskanych wyników i wysuwa racjonalne wnioski. Na pochwałę zasługuje przeprowadzona w ostatnim etapie prac analiza zależności struktura-aktywność w grupie badanych pochodnych 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu. Choć sformułowany przez Doktorantkę postulat, że *„łańcuch boczny o strukturze N-acetylohydrazonu decyduje o wysokiej aktywności cytotoksycznej, szczególnie wobec linii A549 i LoVo"* wydaje się nieco na wyrost, ponieważ pochodne z serii **II**, zawierające ugrupowanie morfolinowe i piperazynylowe połączone z 1,3,4-oksadiazyną poprzez mostek metylenowy, nie były badane w kierunku ich potencjalnej aktywności wobec wspomnianych linii A549 i LoVo.

Podsumowując prace badawcze przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Małgorzaty Strzeleckiej pragnę podkreślić, że zostały one logicznie zaplanowane, a poszczególne zadania badawcze konsekwentnie realizowane przy użyciu trafnie dobranych narzędzi badawczych. Doktorantka udowodniła, że potrafi pracować zespołowo, angażując się w interpretację wyników na każdym etapie realizacji projektu. Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z interdyscyplinarnym charakterem prowadzonych badań, na podkreślenie zasługuje

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

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

również przejrzysta szata graficzna oraz to, że napisana ona została poprawnym językiem, choć Doktorantce, mimo starannej korekty edytorskiej, nie udało się uniknąć nieprecyzyjnych sformułowań:

- str. 20: ustalając strukturę otrzymanych w pierwszej serii związków, Doktorantka początkowo wspomina, że *„...stwierdzono występowanie zjawiska tautomerii (Rysunek 5)"* podczas gdy w rzeczywistości analizuje izomerię geometryczną wiązania podwójnego C=N oraz izomerię wiązania amidowego;
- str. 23: *„...cyklooksygenaza, której nadekspresja często występuje w wielu typach nowotworów, odgrywa istotną rolę w regulacji procesów związanych z proliferacją, angiogenezą, opornością na apoptozę czy zdolnością przerzutowania"*; nadekspresja dotyczy poziomu mRNA, natomiast w przypadku białka należałoby mówić o zwiększonym jego poziomie lub zwiększonej aktywności enzymu.

Mgr Małgorzata Anna Strzelecka jest młodym naukowcem, o wyróżniającym dorobku naukowym, na który składa się 9 prac oryginalnych opublikowanych w latach 2013–2023 w wysoko punktowanych czasopismach z listy JCR (łączna punktacja IF = 33,737, MNiSW = 775 pkt). W swoim dorobku posiada również wystąpienia (komunikaty/postery) zaprezentowane na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska, autorstwa mgr Małgorzaty Anny Strzeleckiej spełnia warunki ustawowe określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Małgorzaty Anny Strzeleckiej do dalszych etapów postępowanie o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań, aktualność tematyki badawczej oraz potencjalne walory aplikacyjne (otrzymano nowe związki o aktywności wyższej niż leki referencyjne) wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Signed by /
Podpisano przez:

Dorota Gabriela
Piotrowska

Date / Data:
2024-04-17 10:30

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

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