



Prof. dr hab. Monika Pitucha
Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Anny Strzeleckiej
pt. „*Synteza i ocena potencjału przeciwnowotworowego nowych 1,3,4-oksadiazolowych oraz 1,2,4-triazolowych pochodnych 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu*”

Rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o monotematyczny cykl publikacji w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod opieką naukową dr hab. Piotra Świątka, prof. uczelni.

Oceniana dysertacja przedstawiona została jako przewodnik do trzech artykułów naukowych znajdujących się w wykazie czasopism naukowych i wydawnictw Ministerstwa Edukacji i Nauki:

1. Piotr Świątek, Teresa Glomb, Agnieszka Dobosz, Tomasz Gębarowski, Kamil Wojtkowiak, Aneta Jezierska, Jarosław J. Panek, Małgorzata Świątek, **Małgorzata Strzelecka**: *Biological evaluation and molecular docking studies of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives of 4,6-dimethyl-2-sulfanylpyridine-3-carboxamide*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, art. 549. **IF=6,208** Punkty MEiN: 140
2. **Małgorzata Strzelecka**, Teresa Glomb, Małgorzata Drąg-Zalesińska, Julita Kulbacka, Anna Szewczyk, Jolanta Saczko, Paulina Kasperkiewicz-Wasilewska, Nina Rembiatowska, Kamil Wojtkowiak, Aneta Jezierska, Piotr Świątek: *Synthesis, anticancer activity and molecular docking studies of novel N-Mannich bases of 1,3,4-oxadiazole based on 4,6-dimethylpyridine scaffold*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, art. 11173. **IF=6,208** Punkty MEiN: 140
3. **Małgorzata Strzelecka**, Benita Wiatrak, Paulina Jawień, Żaneta Czyżnikowska, Piotr Świątek: *New Schiff bases derived from dimethylpyridine-1,2,4-triazole hybrid as cytotoxic agents targeting gastrointestinal cancers: Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking studies*. Bioorganic Chemistry, 2023, 139, art. 106758. **IF = 5,1** Punkty MEiN: 140

Cykl stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF=17,516 oraz 420 pkt MEiN**. W dwóch publikacjach mgr M. Strzelecka jest pierwszym autorem, w jednej autorem korespondencyjnym. Oświadczenia pozostałych współautorów o udziale w publikacjach nie budzą wątpliwości co do kluczowego wkładu Doktorantki w przygotowanie opublikowanych prac naukowych. Publikacje wchodzą w skład monotematycznego cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Strzeleckiej za zgodą wszystkich współautorów.

Kontynuując badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków nad poszukiwaniem aktywności biologicznej w grupie związków heterocyklicznych, w tym opartych na szkielecie 4,6-dimetyloizotiazolo[5,4-b]pirydyny oraz 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu, jako cel rozprawy Doktorantka obrała zaprojektowanie i otrzymanie kilku serii nowych związków hybrydowych o aktywności przeciwnowotworowej. Wykorzystała do tego koncepcję łączenia małowymiarowych fragmentów 1,3,4-oksadiazolu oraz 1,2,4-triazolu o udowodnionej aktywności biologicznej w jedną cząsteczkę, zwaną hybrydą molekularną.

Chociaż współczesna farmakologia dysponuje całym arsenalem substancji leczniczych, to jednak w dalszym ciągu dużym wyzwaniem są choroby nowotworowe. Aby chemioterapia była efektywna lek przeciwnowotworowy musi dotrzeć do komórek rakowych. Niestety, oprócz komórek nowotworowych oddziałuje także na zdrowe komórki ulegające szybkim podziałom. To właśnie brak specyficzności w stosunku do komórek nowotworowych, rozwój lekooporności oraz ograniczona biodostępność konwencjonalnych chemioterapeutyków stanowi problem w leczeniu nowotworów. Poszukiwanie skuteczniejszych i mniej toksycznych leków nie ogranicza się jedynie do pozyskiwania nowych środków farmakologicznie aktywnych. Równie ważne jest wykorzystanie potencjału terapeutycznego znanych substancji leczniczych. Dlatego też uwaga naukowców skupia się na związkach heterocyklicznych, których właściwości biologiczne są obiektem zainteresowania przemysłu farmaceutycznego i badania nad nimi poszerzają stan wiedzy z obszaru chemii leków. Tematyka badań naukowych Doktorantki jest więc aktualna i doskonale wpisuje się w nurt poszukiwania nowych substancji przeciwnowotworowych.

Cel główny prowadzonych przez Doktorantkę badań zdefiniowany został jako otrzymanie kilku serii nowych związków hybrydowych z grupy pochodnych 1,3,4-oksadiazolu i 1,2,4-triazolu o aktywności przeciwnowotworowej.

Cel ten Doktorantka zrealizowała poprzez cele cząstkowe:

- syntezę pochodnych 1,3,4-oksadiazolu (seria I i II) oraz 1,2,4-triazolu (seria III) oraz potwierdzenie budowy poprzez analizę danych spektroskopowych;
- ocenę aktywności cytotoksycznej wszystkich otrzymanych związków wobec wybranych linii komórek nowotworowych oraz komórek prawidłowych;
- ocenę zdolności hamowania oraz powinowactwa pochodnych 1,3,4-oksadiazolu do obu izoform cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2)
- badania biologiczne w modelu *in vitro* oraz *in silico* w celu zaproponowania mechanizmu działania;
- wstępną analizę zależności struktura-aktywność

Mgr Małgorzata Strzelecka zaprojektowała i zsyntetyzowała trzy serie związków: pochodne 1,3,4-oksadiazolu zawierające ugrupowanie N-acylohydrazonowe (seria I), pochodne 1,3,4-oksadiazolu o budowie N-zasad Mannicha (seria II) oraz pochodne 1,2,4-triazolu o budowie zasad Schiffa (seria III).

Związki serii I zostały otrzymane w klasycznej reakcji N-(2-hydrazynylo-2-oksoetylo)-4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu z dwusiarczkiem węgla w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu wytraczone z roztworu rozcieńczonym kwasem solnym. Następnie

przeprowadzono reakcję alkirowania atomu azotu N-4 pierścienia 1,3,4-oksadiazolu za pomocą bromooctanu etylu. Otrzymaną w ten sposób pochodną estrową poddano działaniu wodzianu hydrazyny. Otrzymany hydrazyd był substratem do syntezy dziewięciu nowych pochodnych N-acylohydrazonów z ugrupowaniem 1,3,4-oksadiazolu (*Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 549).

W publikacji drugiej (*Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11173) Doktorantka skupiła się na modyfikacji pierścienia 1,3,4-oksadiazolu otrzymanego z N-(2-hydrazynylo-2-oksoetylo)-4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu (analogicznie jak dla serii I) poprzez wprowadzenie do pierścienia oksadiazolu w pozycji N grupy aminometylowej. Do reakcji aminometylowania wybrała morfolinę i pochodne piperazyny otrzymując dziesięć nowych, nieopisanych wcześniej w literaturze związków o budowie zasad Mannicha.

Publikacja trzecia (*Bioorganic Chemistry* 139 (2023) 106758) stanowi opracowanie serii związków o charakterze zasad Schiffa otrzymanych w wyniku kondensacji pierwszorzędowej grupy aminowej w pozycji N-4 pierścienia 1,2,4-triazolu z aromatycznymi i heteroaromatycznymi aldehydami. W celu otrzymania 4-amino-1,2,4-triazolu przeprowadzono reakcję hydrazidu z dwusiarczkiem węgla w etanolowym roztworze KOH w temperaturze pokojowej. Utworzoną sól ditiokarbazylianu potasu odsączano i poddano reakcji z wodzianem hydrazyny we wrzącym etanolu. W wyniku zakwaszenia mieszaniny otrzymano substrat do dalszych syntez.

Zaprojektowane połączenia zostały otrzymane na drodze kilkietapowych syntez w wyniku, których Doktorantka otrzymała 33 nowe, nieopisane dotąd w literaturze związki pochodne 1,3,4-oksadiazolu oraz 1,2,4-triazolu.

Niewątpliwym atutem pracy są badania biologiczne, które udowodniły wysoki potencjał przeciwnowotworowy uzyskanych połączeń. Spośród otrzymanych związków pochodne N-acylohydrazonowe (seria I) najsilniej hamowały żywotność komórek nowotworowych niedrobnokomórkowego raka ptac (A549) oraz gruczolakoraka okrężnicy (LoVo). Najbardziej obiecujący związek posiadający ugrupowanie 2-bromobenzylidenu silnie hamował aktywność COX-1 i COX-2 oraz wykazywał działanie antyoksydacyjne, także w warunkach stresu oksydacyjnego. Stężenia hamujące IC₅₀ były niższe niż dla substancji referencyjnych (Piroxicam, Meloxicam).

Zadawalającą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowych raka żołądka (EPG) oraz jelita grubego (HT-29) wykazywały związki o budowie zasad Schiffa (seria III). Wybrane zasady Schiffa poddano testowi hamowania glikoproteiny P. Trzy związki wpływają na funkcję wypływu P-gp, znacząco zwiększając akumulację rodaminy 123 w liniach komórkowych raka okrężnicy. Dalsze badania wykazały, że jeden ze związków indukował apoptotyczną śmierć komórek poprzez mechanizm zależny od kaspazy i przez regulując szlak sygnałowy p53-MDM2 w komórkach HT29.

Najbardziej aktywnymi związkami serii (II) były pochodne zawierające w swojej strukturze ugrupowanie 3,4-dichloro- oraz 4-trifluorometylofenylopiiperazynowe. W poszerzonych badaniach biologicznych na liniach komórkowych czerniaka (C32 oraz A375) działały proapoptotycznie, a także zaburzały strukturę cytoszkieletu aktynowego badanych komórek.

Niezwykłe cenne i wartościowe było zastosowanie testu kometowego - metody analitycznej umożliwiającej ocenę stopnia fragmentacji DNA, po działaniu czynników genotoksycznych.

Zastosowaniu tego testu umożliwia identyfikację zarówno pęknięć jedno jak i dwuniciowych. Metoda ta umożliwia detekcję uszkodzeń DNA już na poziomie pojedynczej komórki. Analizowane parametry testu kometowego potwierdziły genotoksyczny charakter obu badanych związków.

Ważnym elementem prowadzonych przez Doktorantkę badań było wykorzystanie metod komputerowych do określenia sposobu wiązania liganda z celem biologicznym. Pozwala to na wyjaśnienie różnic w aktywności różnych pochodnych oraz optymalizację struktury liganda. Uzyskane wyniki sugerują, że związek z ugrupowaniem 4-trifluorometylobenzylidenowym z serii I wykazuje największe powinowactwo do kieszeni wiążącej COX-1 i COX-2 z energiami swobodnymi wiązania niższymi niż leki referencyjne. Z kolei, nowo otrzymane związki serii II zadokowano do czterech wybranych receptorów kinazy tyrozynowej, a uzyskane wyniki porównano z danymi uzyskanymi dla erlotynibu, neratynibu i tepotynibu. Stwierdzono, że powinowactwo wiązania syntetyzowanych związków jest podobne lub mniejsze do powinowactwa wiązania Erlotynibu. Uzyskane wyniki dają podstawę kontynuacji badań nad modyfikacjami zasad Mannicha zawierających pierścień 1,3,4-oksadiazolu oraz otwierają nowe kierunki terapeutyczne. Badania *in silico* wykazały, że zasady Schiffa spełniają określone kryteria lekopodobieństwa. Ocena dostępności biologicznej *in silico* wybranych związków sugeruje, że głównym izoenzymem zaangażowanym w metabolizm związków prawdopodobnie jest CYP2C19 oraz CYP2C9. Z przeprowadzonej analizy wynika również, że związki charakteryzują się słabym wchłanianiem jelitowym oraz nie przechodzą przez barierę krew-mózg.

Podsumowaniem uzyskanych wyników jest analiza zależności struktura aktywność (SAR). Doktoranta sformułowała kilka zależności jednak w tej części zabrakło szerszej dyskusji z danymi literaturowymi.

Praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny i stanowi przykład badań empirycznych opartych na solidnych podstawach teoretycznych realizowanych z wykorzystaniem przejrzystej opisanej metodyki. Całość opracowania napisana jest starannie i czytelnie z zachowaniem poprawności formalno-językowej. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą z zakresu nauk farmaceutycznych niezbędną do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnością wykorzystania nowoczesnych technik badawczych i twórczej analizy otrzymanych wyników. Artykuły wchodzące w skład cyklu, będącego podstawą nadania stopnia naukowego doktora, są bardzo wartościowe i wnoszą istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki farmaceutyczne szczególnie w kontekście badań nad lekiem.

Czytając przedstawione przez mgr Małgorzatę Strzelecką opracowanie nasunęło się kilka zagadnień wymagających wyjaśnienia.

1. Jak wiadomo hydrazyna wykazuje właściwości rakotwórcze (wchłania się również przez skórę) stąd moje pytanie. Czy konieczny był aż 10-krotny nadmiar wodzianu hydrazyny podczas otrzymywania hydrazynu?
2. W autoreferacie Doktorantka błędnie interpretuje rodzaj izomerii w opisanych związkach. Zdecydowanie nie jest to tautomeria a izomeria geometryczna. Co ciekawe prawidłowa interpretacja została zawarta w publikacji.
3. Podwojonym sygnałom rezonansowych w widmach NMR przypisano obecności konformerów cis i trans. Co oznacza, że jest to mieszanina. Czy Doktorantka brała po uwagę rozdzielanie poszczególnych izomerów? Moim zdaniem zagadnienie izomerii wymaga głębszej analizy.
4. Uwagę zwracają obszerne i pogłębione badania biologiczne. Ocena aktywności biologicznej została wykonana we współpracy z innymi ośrodkami. W jakim stopniu Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu uzyskanych wyników badań?
5. W badaniach biologicznych zastosowano różne linie komórek nowotworowych co generowało też różne mechanizmy działania. W jaki sposób Doktorantka planowała kierunek badań biologicznych?

Zamieszczone uwagi mają głównie charakter polemiczny oraz dyskusyjny i nie obniżają oceny merytorycznej rozprawy mogą natomiast być pomocne dla Autorki w planowaniu dalszych badań.

Podsumowując niniejszą recenzję po uwzględnieniu wymogów stawianych rozprawom doktorskim oraz mając na uwadze dorobek naukowy mgr Anny Strzeleckiej stwierdzam, że:


- a) Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie nauk farmaceutycznych. Doktorantka posiada bardzo dobre rozeznanie w światowej literaturze w tematyce prowadzonych badań i potrafi z niej umiejętnie korzystać.
- b) Mgr Małgorzata Strzelecka wykazała się umiejętnością prowadzenia badań naukowych, potrafi zaprojektować proces badawczy, pozyskać i opracować materiał, dobrać odpowiednie metody i w prawidłowy sposób z nich korzystać.
- c) Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Strzeleckiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu zdefiniowanego w tytule i celu pracy.

Rozprawa doktorska autorstwa mgr Małgorzaty Strzeleckiej spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Małgorzaty Strzeleckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Mając na uwadze wysoki poziom naukowy i merytoryczny rozprawy oraz charakter prowadzonych badań wnioskuje o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Strzeleckiej pt. Synteza i ocena potencjału przeciwnowotworowego nowych 1,3,4-oksadiazolowych oraz 1,2,4-triazolowych pochodnych 4,6-dimetylo-2-sulfanylopirydyno-3-karboksyamidu”

Jednocześnie należy zwrócić uwagę na fakt, że przeprowadzone przez mgr Małgorzatę Strzelecką badania mają charakter kompleksowy od zaprojektowania nowych związków poprzez syntezę, badania biologiczne *in vitro*, ocenę bezpieczeństwa stosowania do próby określenia mechanizmu działania. Uwagę zwraca szczegółowość i charakter badań biologicznych. Uzyskane wyniki mają charakter aplikacyjny i w całości zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania IF.

Lublin, 26.04.2024r.

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. dr hab. Monika Pitucha