Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Medycznych

Dr hab. n. med. inż. Monika Stompor-Gorący, prof. UR
Instytut Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: mstompor@ur.edu.pl

Rzeszów, 26 lipca 2021r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Wróbel
„Synteza i badanie aktywności przeciwnowotworowej nowych analogów trimetoprimu"

wykonanej w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Danuty Drozdowskiej.

Podstawę formalną opracowania recenzji stanowi pismo Dziekana Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Pana prof. dr. hab. Wojciecha Miltyka, na podstawie Uchwały Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z dnia 24.06.2021r.

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi cykl złożony z czterech publikacji naukowych opublikowanych w latach 2020-2021, w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ujętych w zbiorach *Journal Citation Reports* (JCR). W skład cyklu wchodzą następujące prace:

1. **Wróbel A.**, Arciszewska K., Maliszewski D., Drozdowska D. (2020) Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. *Journal of Antibiotics (Tokyo),* 73, 5-23; (IF_{2020} = 2.649, MEiN = 70 pkt., cytowania: 15).

2. **Wróbel A.**, Drozdowska D. (2021) Recent design and structure-activity relationship studies on modifications of DHFR inhibitors as anticancer agents. *Current Medicinal Chemistry*, 28, 910-939; (IF_{2020} = 4.530, MEiN = 100 pkt., cytowania: 3).

3. **Wróbel A.**, Maliszewski D., Baradyn M., Drozdowska D. (2020) Trimethoprim: an old antibacterial drug as a template to search for new targets. Synthesis, biological activity and molecular modeling study of novel trimethoprim analogs. *Molecules*, 25, 116; (IF_{2020} = 4.411, MEiN = 100 pkt., cytowania: 3).

4. **Wróbel A.**, Baradyn M., Ratkiewicz A., Drozdowska D. (2021) Synthesis, biological activity, and molecular dynamics study of novel series of a trimethoprim analogs as multi-targeted compounds: dihydrofolate reductase (DHFR) inhibitors and DNA-binding agents. *International Journal of Molecular Sciences, 22*, 3685-3706; (IF_{2020} = 5.923, MEiN = 140 pkt., cytowania: 0).

Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor dla cyklu prac będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora wynosi 17,513, co odpowiada 410 punktom zgodnie z kryterium MEiN (według wykazu z 9.02.2021r.). W każdej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem, oraz posiada w nich dominujący wkład, co dokumentują odpowiednie oświadczenia i opisy udziału współautorów, zamieszczone w rozdziale trzynastym. Współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie publikacji przez Panią mgr A. Wróbel w Jej pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska, której podstawą są wymienione powyżej artykuły zatytułowana została *„Synteza i badanie aktywności przeciwnowotworowej nowych analogów trimetoprimu"*. Komentarz do rozprawy obejmuje 75 stron maszynopisu, podzielonego na 14 rozdziałów, stanowiących logiczną całość. Zaopatrzony jest wprowadzeniem, w którym Doktorantka nakreśla wciąż aktualny problem społeczny, jakim jest systematyczny wzrost zachorowalności na choroby nowotworowe. Szczegółowo opisuje mechanizm działania reduktazy kwasu dihydrofoliowego (DHFR) oraz rolę jej inhibitorów, w tym strukturalnych analogów kwasu foliowego, puryn i pirymidyn, w terapii przeciwnowotworowej. Charakteryzuje oddziaływanie niskocząsteczkowych struktur destabilizujących syntezę kwasów nukleinowych, m.in. netropsyny oraz trimetoprimu. Jasno formułuje cel pracy oraz wymienia poszczególne etapy jego realizacji, którymi były: (i) chemiczna synteza nowych analogów trimetoprimu oraz ich charakterystyka strukturalna; (ii) ocena zdolności wiązania nowych związków z DNA; (iii) oznaczanie aktywności enzymatycznej względem DHFR; (iv) badania molekularne. Bazując na dostępnych danych przedklinicznych oraz klinicznych, wskazuje na znaczenie syntezy nowych analogów strukturalnych stosowanych leków. Każdy z wymienionych etapów wymagał od mgr A. Wróbel znacznego nakładu pracy i zaangażowania. Komentarz zawiera ponadto ustrukturyzowany wykaz stosowanych skrótów, wyniki wraz z wnikliwą dyskusją, streszczenie w wersji polskiej i tożsamej angielskiej, oraz jednolity wykaz cytowanych pozycji literaturowych (43), zebranych w porządku alfabetycznym. W tym miejscu należy zwrócić uwagę na pewną niekonsekwencję Doktorantki i niejednolity charakter cytowań (pozycje 26, 35 str. 42). Tytuł publikacji z pozycji trzeciej (str. 40) jest niepełny. Rozdziały 8-11 stanowią pełnotekstowe publikacje, będące podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Zamieszczono również wykaz dorobku naukowego Pani mgr A. Wróbel, w tym innych opracowań oraz publikacji, wyłączonych z jednotematycznego cyklu prac, wystąpienia konferencyjne, nagrody i wyróżnienia.

Zaplanowany szlak syntez nowych analogów trimetoprimu poprzedzony został dogłębną analizą literatury, co w interesujący sposób Autorka opisała w dwóch artykułach przeglądowych, stanowiących pierwszą część rozprawy doktorskiej. Są one doskonałym wprowadzeniem do badań. Jedna praca prezentuje trimetoprim, oraz inne substancje bazowe, stosowane w projektowaniu efektywnych inhibitorów DHFR. Drugi artykuł przybliża zagadnienie oceny struktura-aktywność nowych inhibitorów ludzkiej podjednostki DHFR o działaniu przeciwnowotworowym. Przeglądy cytują dużą liczbę źródeł, odpowiednio 192 i 204, co przemawia za tym, że można je rekomendować naukowcom zgłębiającym zagadnienia medycyny spersonalizowanej oraz projektowania nowych leków. O dużym

al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: cm@ur.edu.pl

zainteresowaniu środowiska naukowego, oraz wysokiej jakości opracowań, świadczy także fakt, że prace te, choć ukazały się niedawno, bo w 2020 i 2021 roku, były już wielokrotnie cytowane. Ujęta w nich wnikliwa analiza obecnego stanu wiedzy, wskazuje na doskonałe zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze, dotyczącej problematyki badawczej, co pozwoliło jej również sformułować cel swojej pracy doktorskiej, uwzględniając niszę naukową i projektując serię nieopisanych dotąd substancji.

Rezultatem badań jest otrzymanie przez Doktorantkę, z dobrymi wydajnościami (32-60%), 24 nowych połączeń chemicznych. Syntezę chemiczną Pani mgr A. Wróbel prowadziła na podłożu stałym, z wykorzystaniem *p*-nitrofenylowej żywicy Wanga, stosując jako substraty pochodne nitroaniliny oraz nitropirydyny (podstawione grupami: aminową, metoksylową, atomami jodu, chloru i fluoru), a także aromatyczne metoksylowe chlorki kwasowe. Budowę chemiczną oczyszczonych związków, potwierdziła w oparciu o wyniki analiz widm magnetycznego rezonansu jądrowego (^{1}H i ^{13}C NMR), widm masowych oraz chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (HPLC LC-MS).

Zaprojektowane w pracy syntezy pozwoliły na ocenę wpływu budowy chemicznej otrzymanych amidów, w tym elastyczności konformacyjnej, obecności podstawników halogenowych, pierścieni pirydynowego i benzenowego, na aktywność inhibitorową oraz powinowactwo do miejsca aktywnego DHFR jak również zdolność wiązania z DNA i wnoszą wartościowe informacje o charakterze poznawczym i aplikacyjnym.

Dla wszystkich uzyskanych produktów mgr A. Wróbel zaprezentowała interpretację ich widm spektroskopowych. W opisach widm NMR otrzymanych związków brakuje jednak dokładnego przypisania poszczególnych sygnałów do atomów wodoru oraz węgla, co byłoby możliwe po wykonaniu widm dwuwymiarowych 2D NMR. Nie zostały podane również stałe sprzężenia spinowo-spinowego *J* [Hz] we wskazanych multipletach, w tym z układami protonów AA'BB'. W mojej ocenie, dla zwiększenia kwalifikacji oraz doświadczenia młodego doktora, zajmującego się syntezą organiczną, umiejętności te okazałyby się bardzo przydatne, zwłaszcza biorąc pod uwagę nieskomplikowaną strukturę prezentowanych połączeń.

W artykule opublikowanym w *International Journal of Molecular Sciences* (2021) pojawia się informacja sugerująca ocenę czystości otrzymywanych substancji na podstawie analizy TLC przy zastosowaniu układu DCM:MOH:NH_3 7:2:1, oraz, że otrzymywane substancje Doktorantka oczyszczała za pomocą chromatografii preparatywnej. W komentarzu natomiast (str. 26) pisze o układzie DCM:MeOH:MeCN 70:10:20. Pewien niedosyt pozostawia niepełna informacja na temat stopnia czystości badanych biologicznie związków, wyznaczonego metodami analizy instrumentalnej, np. HPLC. Dołączone do publikacji eksperymentalne dane spektroskopowe nie pozwalają tego jednoznacznie stwierdzić. Nie znalazłam również informacji o zgłoszeniu rezultatów badań chemicznych do ochrony patentowej, choć mają one znaczenie praktyczne.

Pani mgr A. Wróbel osiągnęła zamierzony cel: w wyniku wieloetapowej syntezy otrzymała szereg nowych analogów trimetoprimu, zawierających wiązanie amidowe, z których wszystkie wykazywały dobre powinowactwo do plazmidu pBR322 (4361 pz). W badaniach

al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: cm@ur.edu.pl

wstępnych wyłoniła struktury charakteryzujące się najwyższą aktywnością i na ich podstawie planowała dalsze syntezy. Otrzymane w drugim etapie pochodne, zawierające mostek metylenowy obok wiązania amidowego, łączącego pierścienie aromatyczne, wykazywały silniejsze powinowactwo do plazmidu, w porównaniu do związku referencyjnego - netropsyny. W kolejnych etapach, Doktorantka sprawdzała specyficzność wiązania uzyskanych połączeń do określonych sekwencji par zasad, używając syntetycznych dwuniciowych fragmentów DNA, zawierających sekwencje AT - poly(dA-dT)$_2$ oraz GC - poly(dG-dC)$_2$, a także wyznaczyła stałe asocjacyjne wiązania plazmidu ctDNA. W teście z zastosowaniem plazmidu T4 DNA potwierdziła nieinterkalacyjne oddziaływanie otrzymanych struktur z określonymi parami zasad mniejszej bruzdy DNA i wyłoniła trzy związki, charakteryzujące się najwyższymi stałymi wiązania do plazmidu, którymi były pochodne 3A, 5A oraz 18B. Uzyskane w tej części wyniki dostarczyły nowych informacji potrzebnych dla zrozumienia mechanizmu interakcji badanych połączeń z DNA i mogą być odniesieniem przy ocenie ich funkcji farmakologicznej w przyszłościowych testach *in vitro* i *in vivo*. Szczegółowa ocena inhibicyjnego wpływu uzyskanych połączeń na aktywność enzymatyczną DHFR, dokonana zarówno w oparciu o wyniki analiz spektrofotometrycznych, jak również obliczeń teoretycznych, pozwoliła wyłonić struktury o najwyższej energii wiązania do centrum aktywnego enzymu i zdolności tworzenia wiązań wodorowych. Najsilniejszymi inhibitorami DHFR okazały się nowo zsyntezowane związki oznakowane symbolami 3A (IC_{50} = 0,72 μM), 16B (IC_{50} = 0,88 μM) 13B (IC_{50} = 0,89 μM) 2A i 6B (IC_{50} = 0.99 μM). Istotnych danych dostarczyły szczegółowe analizy oddziaływania poszczególnych ligandów z ujemnie naładowaną resztą aminokwasową *Glu-30*, która odgrywa znaczącą rolę w aktywności katalitycznej *h*DHFR. Uzyskane w części eksperymentalnej wyniki ściśle korespondują z badaniami dokowania molekularnego i dynamiki molekularnej (RMSD, RMSF, SASA, Rg), co świadczy o doskonałej intuicji naukowej Doktorantki oraz potwierdza celowość kierunku badań. Zaproponowane w pracy spekulacje na temat potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwbakteryjnej wydają się być prawdopodobne. Niemniej jednak jednoznacznie będzie można to wykazać w testach oceny bezpośredniego wpływu nowych pochodnych trimetoprimu na komórki nowotworowe i bakteryjne, jako pełnego modelu biologicznego, co mam nadzieję zostanie zrobione niebawem, w toku kolejnych prac Pani mgr A. Wróbel oraz jej promotora, Pani dr hab. D. Drozdowskiej. Wartościowych danych dostarczą również wyniki badań na modelach zwierzęcych.

Jednym z głównych założeń pracy było uzyskanie nowych struktur selektywnie ograniczających proliferację komórek nowotworowych, przy jednoczesnym braku wpływu na komórki zdrowe. Czy zdaniem Doktorantki, wyniki przeprowadzonych przez nią doświadczeń, pozwalają wykluczyć ewentualne działania niepożądane otrzymanych pochodnych trimetoprimu, względem ludzkich komórek prawidłowych? Jakie kryterium wyboru linii komórkowych może zaproponować Doktorantka do dalszych analiz, biorąc pod uwagę wybór celu molekularnego, a także uzyskane w ramach pracy doktorskiej rezultaty?

al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: cm@ur.edu.pl

Poproszę również o komentarz dotyczący stabilności oraz rozpuszczalności analogów trimetoprimu w warunkach fizjologicznych. Czy Doktorantka badała rozpuszczalność, ewentualnie stabilność uzyskanych związków w zmiennych warunkach temperaturowych, pH itd.? Wyniki tych analiz mogłyby okazać się bardzo pomocne podczas planowania dalszych badań ich wpływu na biologię komórki.

Oceniając rozprawę doktorską pod względem jakości wprowadzenia do tematyki oraz prezentowanych wyników można stwierdzić, że ma ona układ prawidłowy, a treści przekazane są w sposób przejrzysty. Napisana jest poprawnym językiem, jedynie w niektórych miejscach pojawiają się nieliczne błędy redakcyjne i nieścisłości:

1. przykładowo na stronach: 10, 14, 21, 33, 34, 35, i 50 występują błędy literowe lub interpunkcyjne;
2. skrót „bp" z angielskiego oznacza pary zasad czyli „pz" (str. 10);
3. poprawne określenia reszt „metenylowej" i „formylowej" to odpowiednio grupy metinowa i aldehydowa (str. 15);
4. nazwa szczepu *Staph. Saprophyticus* powinna być napisana inaczej: *S. saprophyticus*, lub *Staphylococcus saprophyticus*, podobnie jak wymieniona po raz pierwszy w tekście powyżej nazwa *Enterobacter species* (str. 18);
5. metotreksat to lek o działaniu cytostatycznym (str. 21);
6. łacińska nazwa szczepu *Acinetobacter baumannii* powinna być napisana kursywą (str. 40);
7. MOH w drugiej publikacji eksperymentalnej to raczej MeOH (metanol) (str. 15/21).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, której autorką jest Pani mgr A. Wróbel, dotyczy interesującego zagadnienia naukowego, jakim jest poszukiwanie nowych struktur chemicznych, będących analogami znanych i stosowanych leków, jako związków selektywnie celujących w komórki nowotworowe. W mojej ocenie badania dotyczące syntezy nowych pochodnych trimetoprimu wiążących się z DNA, oraz wykazujących dobrą aktywność inhibicyjną wobec DHFR – enzymu regulującego metabolizm kwasów nukleinowych, aminokwasów, a także wzrost i różnicowanie komórek, są ciekawe i rozwojowe, szczególnie z uwagi na otrzymanie nowych substancji, które z pewnością będą inspiracją do dalszych pełnoprofilowych analiz pod kątem ich działania farmakologicznego. Są one ważne nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale również możliwego zastosowania w praktyce, ponieważ dotyczą otrzymywania nowych połączeń o wysokim potencjale aplikacyjnym m.in. w leczeniu nowotworów. Dostępność nowych pochodnych może być także pomocna w wytyczaniu kierunków poszukiwania bakteriostatyków oraz środków o działaniu przeciwgrzybiczym.

Doświadczenie Doktorantki w zakresie wykorzystania różnych metod badawczych, szczególnie syntezy chemicznej, metod spektroskopowych oraz chromatograficznych, a także analiz biochemicznych, uzupełnione znajomością interpretacji wyników badań teoretycznych tj. dokowania molekularnego i dynamiki molekularnej, jednoznacznie wskazuje na jej zaawansowaną wiedzę w zakresie tematyki pracy. Zastosowany zestaw metod i analiz pozwolił

al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: cm@ur.edu.pl

na osiągnięcie założonego celu oraz pełną weryfikację postawionych hipotez badawczych. Przeprowadzone badania są przykładem precyzyjnie przemyślanego projektu badawczego, którego rezultaty wnoszą istotną wartość do rozwoju dyscypliny nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Doktorantka dokonała również szerokich studiów literaturowych, co w syntetyczny sposób udokumentowała w postaci wartościowych naukowo opracowań, o charakterze poglądowym. Pracę doktorską Pani mgr Agnieszki Wróbel oceniam bardzo wysoko, a przedstawione w recenzji nieliczne uwagi, głównie o charakterze redakcyjnym, mają znaczenie marginalne i w niczym nie umniejszają wartości merytorycznej tego opracowania.

Wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Wróbel pt.: *„Synteza i badanie aktywności przeciwnowotworowej nowych analogów trimetoprimu"* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Z nadmiarem spełnia warunki Ustawy stawiane dysertacjom doktorskim, dlatego wnoszę o dopuszczenie Autorki pracy Pani mgr Agnieszki Wróbel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chciałabym również podkreślić pokaźny ilościowo i wartościowy naukowo dorobek Pani mgr Agnieszki Wróbel, biorąc pod uwagę etap jej rozwoju naukowego. Oprócz czterech prac stanowiących cykl publikacji, będących podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora, Pani mgr Agnieszka Wróbel jest współautorką dwóch dodatkowych prac naukowych, opublikowanych w czasopismach *Investigational New Drugs* oraz *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, zamieszczonych w bazie JCR, 2 monografii i 30 streszczeń zjazdowych (w tym 6 zagranicznych).

Jednocześnie, ze względu na zakres, jakość oraz znaczący wkład w poszerzenie i weryfikację dotychczasowej wiedzy naukowej, przedstawionych w pracy doktorskiej badań, a także fakt, że praca stanowi jednotematyczny zestaw czterech publikacji o wysokim standardzie międzynarodowym, stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.

Monika Stompor-Gorący

Dr hab. n. med. inż. Monika Stompor-Gorący, prof. UR

al. mjr. W. Kopisto 2a, 35-959 Rzeszów
tel.: +48 17 872 11 53
e-mail: cm@ur.edu.pl