



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-30
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

Poznań, dnia 29 listopada 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Wpływ nowych sulfonamidowych pochodnych zawierających układ pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny na indukcję apoptozy w komórkach raka jelita grubego DLD-1 i HT-29**

Imię i nazwisko: **mgr Anna Szymanowska**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Zakład Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz Instytut Nauk Chemicznych Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach**

Promotorzy: **prof. dr hab. Anna Bielawska oraz dr hab. Mariusz Mojzych, prof. Uczelni**

W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Anna Szymanowska podjęła się oceny wpływu **sulfonamidowych pochodnych zawierających układ pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny na indukcję apoptozy w komórkach raka jelita grubego DLD-1 i HT-29**. Tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę wydaje się niezwykle istotna naukowo, jak i społecznie. Pochodne 1,2,4-triazyny to związki o ustalonej renomie w chemii leków. Na przestrzeni minionego półwiecza wiele z nich wykazało się interesującymi właściwościami przeciwwirusowymi, przeciwwrzędnymi, przeciwwirusowymi, przeciwzapalnymi i obniżającymi ciśnienie krwi. Wybrane pochodne 1,2,4-triazyny znalazły zastosowanie w terapii, bądź wykazały obiecujące aktywności w badaniach klinicznych, jak np. lamotrygina o działaniu przeciwpadaczkowym, tirapazamina o działaniu przeciwnowotworowym, czy ceftriakson o działaniu przeciwbakteryjnym. Tematyka dysertacji z jednej strony dotyka zagadnień czysto poznawczych zmierzających do oceny *in vitro* na liniach komórkowych raka jelita grubego nowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny. Z drugiej strony włącza się w nurt poszukiwań skutecznych i bezpiecznych leków do terapii nowotworów jelita grubego, stwarzając perspektywy praktyczne tj. znalezienia nowych substancji aktywnych farmaceutycznie. Należy podkreślić, że ten multidyscyplinarny temat jest rozwijany od wielu lat z bardzo interesującymi rezultatami w Zakładzie Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz w Instytucie Nauk Chemicznych Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach pod kierunkiem promotorów niniejszej pracy, Pani prof. dr hab. Anny Bielawskiej oraz Pana dr hab. Mariusza Mojycha, prof. Uczelni.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Szymanowskiej stanowi spójne tematycznie 172 stronicowe opracowanie, które zostało napisane bardzo poprawnym językiem naukowym. Dysertacja zawiera wszystkie wymagane rozdziały, w tym wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz bibliografię. Doktorantka na końcu pracy zawarła kilka ważnych informacji dotyczących sposobu rozpowszechniania wyników i swojego rozwoju naukowego.

Dowiadujemy się, że mgr Anna Szymanowska jest współautorką 9 publikacji w czasopismach z chemii medycznej i chemii, a w 7 z nich jest pierwszym lub drugim autorem. W Jej dorobku znajduje się ponadto 29 wystąpień konferencyjnych, 1 patent do UP RP, 1 zgłoszenie do UP RP i 1 międzynarodowe zgłoszenie patentowe w trybie PCT. Łączny IF wszystkich publikacji Doktorantki wynosi 26,146, co przekłada się na 647 pkt. MNiSW i świadczy o Jej dużym zaangażowaniu w naukę. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera starannie przygotowane 33 ryciny, 22 schematy i 7 tabel, które znacznie ułatwiają analizę omawianych wyników. Piśmiennictwo liczy 223 odnośniki literaturowe, które zostały odpowiednio dobrane i odnoszą się do czasopism naukowych, w większości z ostatnich 15 lat.

Doktorantka dokonała właściwego wyboru tematyki do obszernego **wstępu**, w którym nakreśliła bardzo obszernie problematykę śmierci komórkowej. Rozpoczęła od szczegółowego omówienia molekularnych mechanizmów śmierci komórkowej. Dalej skupiła się na apoptozie i jej głównych szlakach sygnałowych. W kolejnych podrozdziałach zebrała informacje na temat kaspaz i białek Bcl-2 oraz ich roli w procesie apoptozy, a także o inhibitorach kaspaz i ich znaczeniu w terapii przeciwnowotworowej. W dalszej części skupiła się najpierw na omówieniu właściwości fizykochemicznych i wybranych metod syntezy 1,2,4-triazyn, a następnie przedstawieniu ich aktywności biologicznej. W kolejnym podrozdziale omówiła tematykę skondensowanych pochodnych 1,2,4-triazyny. Materiał literaturowy jest bardzo spójny tematycznie, zarówno z tytułem, jak i dalej przedstawianą tematyką badań, stąd doskonale wprowadza w kolejne rozdziały rozprawy, sprawiając że zdefiniowany cel, wyniki i ich omówienie oraz wnioski interesująco łączą się z poruszonymi już na wstępie zagadnieniami.

Zaplanowane w **celu** pracy badania dotyczyły opracowania syntezy nowych sulfonamidowych pochodnych układu pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny wraz z oceną profilu ich aktywności przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro* względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29. Cel ten miał być realizowany szczegółowo poprzez następujące etapy: (i) Dokonanie wyboru związku wyjściowego, a więc znanej z piśmiennictwa 1-fenyl-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny, którą poprzez reakcję chlorosulfonowania, a następnie kondensacji z odpowiednimi aminami Doktorantka postanowiła przekształcić w odpowiednie pochodne sulfonamidowe; (ii) Badania biologiczne na liniach komórkowych raka jelita grubego DLD-1 i HT-29, z użyciem 5-fluorouracylu oraz roskowityny jako związków referencyjnych. Pani mgr Anna Szymanowska zaplanowała ocenę właściwości cytotoksycznych związków z użyciem testu MTT względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29, a dla najbardziej aktywnych związków pogłębione badania w zakresie aktywności antyproliferacyjnej z wykorzystaniem testu inkorporacji znakowanej [³H]-tymidyny do DNA obu linii komórkowych oraz dalszą ocenę ich wpływu na indukcję apoptozy i aktywność kaspaz 8, 9, 10 i 3/7 metodą cytometrii przepływowej.

W **części materiały i metody** Doktorantka zawarła charakterystykę materiałów, a więc zastosowanych w badaniach biologicznych linii komórkowych, odczynników i aparatury. W dalszej części przedstawiła wnikliwą charakterystykę zastosowanych procedur chemicznych, preparatykę związków niepublikowanych, opisała metodykę szczegółowych procedur syntezy oraz ocenę tożsamości nowych związków. W kolejnych

podrozdziałach wyczerpująco wyjaśniła metodykę pomiaru cytotoksyczności związków, pomiaru biosyntezy DNA, ocenę indukcji apoptozy z wykorzystaniem aneksyny V i jodku propidyny, ocenę indukcji apoptozy z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, ocenę mitochondrialnego potencjału błonowego, ocenę aktywności kaspaz: 8, 9, 10 i 3/7. Na zakończenie badań wykonała analizę statystyczną z użyciem programu GraphPadProsm 8.0.

Pani mgr Anna Szymanowska w rozdziale **wyniki**, na 45 stronach, szczegółowo przedstawiła przeprowadzone badania. Część badań dotycząca syntezy związków została podana bardzo zwięźle, a część biologiczna bardzo obszernie. *Podczas lektury tej części pracy odczułem pewien niedosyt w zakresie możliwego w świetle wcześniej przedstawionych danych w rozdziale materiały i metody, omówienia również charakterystyk fizykochemicznych wybranych nowych związków aktywnych.* Synteza związków pośrednich 5-acetylo-3-metylosulfanylo-1,2,4-triazyny i jej fenylohydrazonu, a także 1-fenylo-3-metylo-5-metylosulfanylo-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny i jej 5-metylosulfonylowej pochodnej została oparta o metody literaturowe. To właśnie pochodna sulfonowa została poddana reakcjom chlorosulfonowania, a następnie kondensacji z kilkoma związkami z grupą aminową, co doprowadziło do uzyskania pochodnych sulfonamidowych 5-metylosulfonylo-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny. Związki te w reakcji nukleofilowego podstawienia grupy metylosulfonowej azydkiem sodu zostały przekształcone w trójcykliczne pochodne tetrazolowe. Bardzo ciekawe są także dwa związki wyodrębnione dodatkowo po reakcjach kondensacji, które są wyposażone w pozycji 5, odpowiednio w grupę 1,3-dihydroksi-2-metylopropan-2-yloaminową i pirolidynową. W dalszej części mgr Anna Szymanowska przedstawiła wyniki badań biologicznych w zakresie oceny cytotoksyczności na liniach komórkowych raka jelita grubego DLD-1 i HT-29 z wykorzystaniem testu MTT, co pozwoliło na wyselekcjonowanie 3 sulfonamidowych pochodnych 5-metylosulfonylopirazolo[4,3-e][1,2,4]triazyny charakteryzujących się aktywnościami IC_{50} na poziomie 9,30-9,70 μ mol na komórkach DLD-1 oraz 1 pochodnej z aktywnością IC_{50} 5,80 μ mol na komórkach HT-29. Z kolei ocena cytotoksyczności sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-e]tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny pokazała ich aktywność cytotoksyczną z wartościami IC_{50} względem linii komórkowych DLD-1 i HT-29 w zakresach stężeń odpowiednio 1,10-4,61 μ mol i 1,70-3,90 μ mol. Badania cytotoksyczności pozwoliły na wyselekcjonowanie 3 najbardziej aktywnych sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-e]-tetrazolo[4,5-b][1,2,4]triazyny do badań biologicznych. Związki te mgr Anna Szymanowska poddała ocenie hamowania procesu biosyntezy DNA w komórkach raka jelita grubego DLD-1, gdzie dla jednego ze związków (oznaczonego w pracy 96a), który w największym stopniu hamował proliferację komórek raka jelita grubego określiła stężenie potrzebne do zahamowania biosyntezy DNA w 50% przy 0,8 μ mol. Z kolei dla innej pochodnej (oznaczonej w pracy 96b) w komórkach raka jelita grubego HT-29 stwierdziła hamowanie biosyntezy DNA przy 2,3 μ mol. W dalszych badaniach Doktorantka oceniła wpływ związków na indukcję apoptozy w komórkach obu linii nowotworowych raka jelita grubego z wykorzystaniem aneksyny V i jodku propidyny. Uzyskane wyniki zostały przedstawione i omówione w formie cytogramów. Uzyskane dla tej części badań wyniki zostały dodatkowo potwierdzone z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego po wykonaniu barwienia oranżem aktydyny i bromkiem etydyny. W kolejnych pracach mgr Anna Szymanowska skupiła się na ocenie wpływu testowanych związków na zmianę

mitochondrialnego potencjału błonowego w komórkach raka jelita grubego DLD-1 i HT-29 z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Należy podkreślić, że badane związki w dużo większym stopniu niż referencyjnie zastosowany 5-fluorouracyl i roskowityna obniżały potencjał mitochondrialny. Zwieńczeniem badań była na początku ocena wpływu badanych związków wykonana na obu liniach komórek nowotworowych jelita grubego na aktywność kaspaz 9, 8 i 10, która pozwoliła na konkluzję, że badane związki aktywują kaspazy. W końcowym podrozdziale tej części Doktorantka przedstawiła wyniki badań w zakresie zdolności sulfonamidowych pochodnych układu pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny do aktywacji kaspaz 3/7 w komórkach DLD-1 i HT-29.

W rozdziale **dyskusja** Pani mgr Anna Szymanowska uzasadniła dokonany wybór przedmiotu badań i przyjętą strategię syntezy oraz funkcjonalizacji pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyn. Badania zostały zaplanowane bardzo racjonalnie, a przeprowadzona dyskusja zarówno w zakresie uzyskanych danych z syntezy, jak i badań biologicznych została wykonana bardzo kompleksowo. *Doktorantka zaobserwowała niższą podatność podstawnika metylosulfanylowego w reakcjach podstawienia nukleofilowego w układzie pirazolo[4,3-*e*]-[1,2,4]triazyny. Czy można ten efekt wyjaśnić?* Za bardzo interesującą uważam przedstawioną w tej części pracy doktorskiej dyskusję dotyczącą tautomerii azydo-tetrazolowej w układzie pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny. Doktorantka omawiając także analizę produktów oznaczonych symbolami 96a-f z użyciem metod spektroskopii NMR wspomniała o szczątkowych sygnałach od form azydkowych. *Czy przy okazji badań z użyciem ¹H i ¹³C NMR rozważano badania ¹⁵N NMR? Zastanawiałem się także, czy z literatury lub doświadczeń Doktorantki coś wiadomo na temat równowagi tautomerycznej pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyn w roztworach wodnych lub wodno-alkoholowych? Czy dla aktywności biologicznej tych związków któraś z form tautomerycznych jest bardziej preferowana?* W poddanej mojej ocenie dysertacji Doktorantka przeprowadziła kompleksową ocenę aktywności biologicznej sulfonamidowych pochodnych 5-metylosulfonylo-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny i pirazolo[4,3-*e*]-tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny względem dwóch linii komórkowych raka jelita grubego DLD-1 i HT-29. Dane te zostały bardzo krytycznie przedyskutowane w kontekście wcześniejszych doświadczeń Zespołu, jak i bardzo aktualnego w tej dziedzinie światowego piśmiennictwa. Dane *in vitro* pozwoliły też na wyselekcjonowanie trzech sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyn do dalszych badań z uwagi na wykazany potencjał względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29.

W rozdziale **wnioski** Pani mgr Anna Szymanowska przedstawiła najważniejsze aspekty przeprowadzonych badań. *W przypadku wniosku 2 zastanawiam się, jakie badania Doktorantka mogła jeszcze zaplanować celem wzmocnienia tezy dotyczącej dominującej formy tetrazolowej w badanych rozpuszczalnikach. Moja uwaga wynika z tego, że w dysertacji zostały przedstawione badania z użyciem spektroskopii NMR w jednym rozpuszczalniku. Czy odnosząc się do badań w różnych rozpuszczalnikach Doktorantka miała na myśli również dane literaturowe i inne dane jeszcze nieopublikowane?*

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Szymanowskiej jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został poprawnie zrealizowany w części eksperymentalnej, przedstawiony w wynikach i ich dyskusji, a także wnioskach. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca w szerokiej perspektywie oceny wpływu sulfonamidowych pochodnych zawierających układ pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny na

indukcję apoptozy w komórkach raka jelita grubego DLD-1 i HT-29 na styku stosowania zaawansowanych metod chemii medycznej, chemii organicznej i biochemii, wydawała się bardzo racjonalna. W miarę postępu prac badawczych została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do bardzo interesujących wniosków. Wykonane przez mgr Annę Szymanowską multidyscyplinarne badania pozwoliły na zaprojektowanie i przeprowadzenie wieloetapowej syntezy sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*]-[1,2,4]triazyny i wykazanie dla sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny interesującej aktywności cytotoksycznej i antyproliferacyjnej względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29. Ponadto dla wybranych trójcyklicznych sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*]-[1,2,4]triazyny Doktorantka wykazała właściwości proapoptotyczne względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29. W świetle obecnego stanu wiedzy tego typu kompleksowe badania stwarzają duże perspektywy aplikacyjne. Dysertacja jest bogata warsztatowo, pokazuje bardzo metodyczne podejście przy otrzymywaniu nowych potencjalnych związków aktywnych farmaceutycznie, poczynwszy od syntezy chemicznej, poprzez charakterystykę fizykochemiczną nowych sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*]-[1,2,4]triazyny, po kompleksową ocenę właściwości biologicznych metodami *in vitro*, w zakresie oceny ich wpływu na indukcję apoptozy w komórkach raka jelita grubego DLD-1 i HT-29. Dane eksperymentalne uzyskane w badaniach biologicznych dla nowych związków zostały krytycznie omówione w kontekście światowego piśmiennictwa i wcześniejszych doświadczeń Współpracowników. Doktorantka bardzo starannie udokumentowała przeprowadzone badania, a także dokonała wnikliwej ich analizy zarówno w zakresie przeprowadzonych syntez, jak i badań biologicznych.

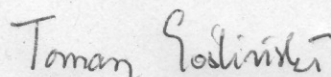
Wyniki przedstawione w dysertacji mają dużą wartość poznawczą dla chemii leków i z pewnością są dobrym punktem wyjścia do planowania dalszych prac. Recenzowana praca wyróżnia się w kilku aspektach: (i) Badania zostały przeprowadzone według dobrze przemyślanego schematu i objęły syntezę i pogłębione badania biologiczne *in vitro*, w tym molekularnego mechanizmu działania serii nowych sulfonamidowych pirazolo-[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyn, które posiadają właściwości cytotoksyczne względem komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29 w zakresie stężeń mikromolarnych, (ii) Badania doprowadziły do wymiernego efektu poznawczego jakim stało się wyselekcjonowanie trzech związków o interesującej aktywności względem linii komórek raka jelita grubego DLD-1 i HT-29, a uzyskane wyniki są doskonałym punktem wyjścia do dalszych badań podstawowych oraz aplikacyjnych, (iii) Doktorantka zastosowała i umiejętnie wykorzystała nowoczesny warsztat badawczy chemii medycznej, zarówno pod względem doboru reagentów, technik syntezy chemicznej, charakterystyki fizykochemicznej oraz zastosowanych badań do oceny aktywności biologicznej, (iv) Część wyników przedstawionych w dysertacji została opublikowana w czasopismach z chemii medycznej o uznanej renomie.

Dysertacja jest napisana bardzo poprawnym językiem, zwracam uwagę na drobne kwestie do rozważenia, na które napotkałem w pracy: (i) s. 15 – powinno być „neutrofili”, (ii) str. 36 – zapewne chodziło o odwołanie do Ryciny 9, na której przedstawiono strukturę chemiczną tirapazaminy, (iii) w pracy stosowano nazwę N-bromosukcynoimid dla imidu kwasu bursztynowego (NBS), która jest spotykana w piśmiennictwie, ale zalecałbym korzystanie z polskiego rdzenia nazwy, (iv) w wielu miejscach pracy napotkałem na skróty dotyczące godziny – h i stężeń μM , zalecałbym stosowanie godz. i μmol , (v) s. 46 i inne miejsca w pracy – „zsyntetyzowane” – to galizm (fr. *synthétiser*), sugeruję po prostu syntezować, (vi) Cel pracy – fragmenty tej części zostały przedstawione w konwencji prezentacji wyników badań, (vii) Część doświadczalna – Przy

przedstawianiu danych ^1H NMR podawanie stałej J po zaokrągleniu do najbliższej wartości 0,5 pozwala na uniknięcie rozbieżności w odczycie stałych J z widm na poziomie znacznie przekraczającym błąd ostatniej cyfry znaczącej, (viii) s. 84 – Sugerowałbym nazywanie podstawnika w strukturze związku 97d w pozycji 5 tak jak został określony w nazwie chemicznej na s. 72, czyli 1,3-dihydroksy-2-metylopropan-2-yloaminowy.

Reasumując uważam, że Pani mgr Anna Szymanowska doskonale zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym. Moja wysoka ocena wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji wynika z umiejętnego połączenia przez Doktorantkę wiedzy z zakresu syntezy chemicznej i chemii leków. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Anny Szymanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji dysertacji, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny z wnioskiem o wyróżnienie przedmiotowej pracy doktorskiej.


prof. dr hab. Tomasz Gośliński