



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

Recenzja

**rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Anny Szymanowskiej
pt. „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”
przedłożonej Senatowi Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku celem uzyskania
stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych**

Według danych opublikowanych przez WHO choroby nowotworowe są jednymi z najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Rozwój nowotworu jest procesem wieloetapowym, który może zostać zainicjowany w każdej tkance, we wszystkich narządach i rozwijać się niezależnie od wieku. W ciągu ostatnich 20 lat klasyczne podejście chemioterapii przeciwnowotworowej wykorzystujące leki cytostatyczne zostało uzupełnione o strategię oparte na mechanizmach ściśle związanych z fenotypem raka. Korkiem milowym było opracowanie trastuzumabu, pierwszego przeciwciała monoklonalnego do zwalczania raka piersi, czy imatybinu, pierwszego małocząsteczkowego inhibitora kinazy tyrozynowej. Przełomowym odkryciem, które zostało wyróżnione w 2018 r. przez Norweski Komitet Noblowski było poznanie roli układu immunologicznego w procesach nowotworowych. Pomimo tak dużego postępu i poznaniu genetycznych podstaw rozwoju procesu nowotworowego, niejasna heterogenność choroby, działania niepożądane dostępnych leków i lekooporność nadal stanowią istotny problem w optymalizacji skutecznych form walki z rakiem.

Przedstawione w recenzowanej pracy wyniki nawiązują do tematyki badań prof. Anny Bielawskiej, związanej z poszukiwaniem związków o aktywności przeciwnowotworowej i badaniem ich mechanizmu działania przeciwnowotworowego oraz zainteresowań naukowych dr. hab. Mariusza Mojzycha, prof. Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, dotyczących problemów syntezy i projektowania nowych związków o aktywności biologicznej w tytułowej klasie.

Licząca 172 strony praca Pani mgr Anny Szymanowskiej ma klasyczny układ. Składa się z wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, materiałów i metodyki, wyników, dyskusji, streszczenia oraz 223 pozycji aktualnego piśmiennictwa. Pracę uzupełnia charakterystyka dorobku naukowego. Sposób przedstawienia pracy jest czytelny i nie budzi zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje bardzo sprawne posługiwanie się przez autorkę terminologią specjalistyczną.

Podstawą projektowania skutecznych leków przeciwnowotworowych jest zrozumienie skomplikowanych procesów leżących u podstaw rozwoju procesu nowotworowego. Takie zadanie obrała sobie Doktorantka wprowadzając we wstępie w obszar tematyczny rozprawy. Doktorantka zaprezentowała złożone mechanizmy śmierci komórkowej. Szczególną uwagę poświęciła procesowi apoptozy – wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym szlakom przekazywania sygnału zaangażowanym w kontrolę procesów proliferacji oraz eliminacji komórek prawidłowych i nowotworowych. Zwróciła uwagę na rolę białek Bcl w procesie apoptozy oraz wskazała na grupę selektywnych lub mieszanych antagonistów białek Bcl-2 i Bcl-W1, zarejestrowanych leków lub kandydatów na leki, jako nową opcję terapeutyczną dla realizacji nierównej walki z nowotworami.

Autorka zwróciła ponadto uwagę na zwiększające się zrozumienie funkcji złożonego charakteru enzymów o cechach kaspaz, co otwiera perspektywę na opracowanie bardziej celowanych sposobów eliminacji komórek zmienionych nowotworowo. Ten aspekt pracy jest szczególnie oryginalny i budzi moje zainteresowanie.

Ważnym elementem wprowadzenia w obszar prac eksperymentalnych jest prezentacja metod syntezy związków stosowanych w chemioterapii nowotworów oraz schorzeń infekcyjnych opartych na rdzeniu różnie podstawionego układu 1,2,4-tiazyny. Uważam ten fragment za wartościowy. W części wstępnej wprowadzone zostały wszystkie konieczne dla dalszego zrozumienia pracy terminy oraz omówiony został, w satysfakcjonującym zakresie, aktualny stan wiedzy. To bardzo zgrabnie napisane studium literaturowe.

Cel swoich badań Doktorantka sformułowała jako opracowanie drogi syntezy nowych sulfonamidowych pochodnych układu pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny oraz ocenę aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych związków w warunkach *in vitro* względem wybranych dwóch linii komórek gruczolakoraka jelita grubego DLD-1 i HT-29. Zróżnicowanie strukturalne zaplanowanych pochodnych dotyczy fragmentu aminowego ugrupowania arylosulfonamidowego i obejmuje ester metylowy *L*-proliny, ester metylowy 4-*trans*-hydroksy-*L*-proliny, (*R*)-(-)-2-amino-1-propanol, 2-amino-2-metylo- 1,3-propanodiol, 2-amino-2-metylo-1-propanol i pirolidynę.

Pierwszy cel badań własnych Doktorantka zrealizowała wykonując pracę chemika syntetyka. Zaprojektowane związki o strukturze sulfonamidowych pochodnych układu pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny Doktorantka otrzymała w wyniku wieloetapowych syntez. Kluczowy synton o strukturze 1-fenyl-3-metylo-5-metylosulfonylo-1*H*-pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny poddała kolejno chlorosulfonowaniu oraz kondensacji z aminami, otrzymując pożądane produkty pośrednie o budowie sulfonamidowej. W ostatnim etapie, w wyniku przeprowadzenia eleganckiego przejścia syntetycznego – substytucji nukleofilowej 5-metylosulfonowych pochodnych 1*H*-pirazolo-[4,3-*e*][1,2,4]triazyny z azdykiem sodu, Doktorantka dobudowała fragment tetrazolowy i otrzymała zaprojektowane pochodne pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazynowe **96a–96f**.

Związki te zostały oczyszczone przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej oraz scharakteryzowane strukturalnie z wykorzystaniem nowoczesnych metod analizy spektralnej, tj. analiz ^1H , ^{13}C NMR, IR, HRMS oraz w oparciu o wyniki analizy elementarnej.

Realizując drugi cel pracy, Doktorantka wyznaczyła aktywność cytotoksyczną serii 6 związków pośrednich (**95a–95f**) oraz 6 produktów finalnych (**96a–96f**). Testy te wykonała stosując metodę skringingu fenotypowego (test MTT) na liniach komórkowych raka jelita grubego DLD-1 oraz linii HT-29.

Kolejno, prowadząc poszerzone badania nad określeniem aktywności przeciwnowotworowej trzech wyselekcjonowanych związków **96a**, **96b**, **96c**, Doktorantka dowiodła opanowania metod służących: *i*) ocenie aktywności antyproliferacyjnej związków z wykorzystaniem testu inkorporacji [^3H]-tymidyny do DNA, *ii*) ocenie wpływu nowych związków na proces apoptozy, *iii*) ocenie zmian morfologicznych zachodzących pod wpływem badanych związków technikami obrazowania z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego, *iv*) weryfikacji wpływu związków na funkcję organelli prowadząc pomiar mitochondrialnego potencjału błonowego oraz *v*) określeniu wpływu związków na aktywność kaspaz 8, 9, 10 i 3/7 w komórkach DLD-1 i HT-29 z zastosowaniem metody cytometrii przepływowej. Opis metodyki badań biologicznych jest rzetelny i dokładny. Wskazuje to na świadomy wybór wiarygodnych i dostępnych technik badawczych.

Niezwykle wartościowym rozdziałem recenzowanego opracowania jest dyskusja wyników, która prezentuje szeroką wiedzę Doktorantki, porządkuje najważniejsze wyniki badań uzyskane w badaniach chemicznych i biologicznych. W tym rozdziale zaprezentowane zostały wszystkie główne obserwacje poczynione przez Doktorantkę, w kontekście opublikowanych danych literaturowych.

Zrealizowane badania potwierdziły poprawność założeń, wskazujących na możliwość opracowania w grupie sulfonamidowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny połączeń o aktywności przeciwnowotworowej. Badane sulfonamidowe pochodne pirazolo[4,3-*e*]tetrazolo[4,5-*b*][1,2,4]triazyny (**96a–f**) wykazały wyższą aktywność w porównaniu do metylosulfonowych pochodnych pirazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazyny (**95a–f**). Związki **96a–c** posiadały najwyższą aktywność przeciwnowotworową i co najważniejsze silniejsze właściwości cytotoksyczne w porównaniu do związków referencyjnych – 5-fluorouracylu i roskowityny, względem obu nowotworowych linii komórkowych. Wartość IC₅₀ dla najbardziej aktywnej pochodnej **96a** względem linii DLD-1 wynosiła 1,1 μM, a względem linii HT-29 1,7 μM.

W poszerzonych badaniach, mających na celu określenie molekularnego mechanizmu działania cytotoksycznego związków, Doktorantka udowodniła, że wyselekcjonowane pochodne, wykazują właściwości proapoptotyczne na drodze szlaku wewnętrznego oraz zewnętrznego. Wiązane jest to odpowiednio ze spadkiem mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi_m$), wzrostem liczby komórek z aktywną kaspazą 9 oraz zwiększeniem liczby komórek z aktywnymi kaspazami 8 i 10.

Potwierdzam wysoką staranność Doktorantki w opracowaniu i prezentacji wyników badań, niemniej wywiązując się z obowiązku recenzenta wspomnieć muszę o drobnych błędach edytorskich, np. rozwinięcie skrótu powinno pojawiać się w tekście, w miejscu jego pierwszego zastosowania, ponadto jon pseudomolekularny zwykle przedstawiany jest jako $[M+H]^+$, a nie $[M^++H]$, a nazwy chemiczne związków zapisywane są z dużej litery, traktując je jako niezależne zdanie.

Poniżej przedstawiam kilka uwag lub problemów wymagających wyjaśnienia oraz mogących posłużyć w dalszych pracach badawczych:

- 1) zastanawia mnie, czy można uznać ugrupowanie sulfonamidowe jako element strukturalny odpowiedzialny za działanie plejotropowe związków biologicznie aktywnych o budowie sulfonamidowej (strona 134, 4 wiersz od dołu)?
- 2) zastanawiam się jakimi przesłankami kierowano się podczas projektowania i doboru fragmentów aminowych, głównego elementu różnicującego w strukturze testowanych związków? Interesującym byłoby podjęcie próby analizy zależności między strukturą nowootrzymanyh związków a przykładowo związkami pozbawionymi ugrupowania sulfonamidowego? Czy podjęto próby syntezy analogów amidowych?

- 3) planując i optymalizując syntezy coraz większą uwagę zwraca się aktualnie na kwestie ekologii i ograniczenia zastosowania toksycznych rozpuszczalników i reagentów. Czy podejmowano próby zastąpienia benzenu, DMSO na etapie syntezy oraz chloroformu na etapie izolacji i oczyszczania związków z zastosowaniem chromatografii kolumnowej, ich odpowiednikami z grupy tzw. „zielonych rozpuszczalników”?
- 4) związki **96a** i **96b** otrzymano w reakcji *L*-proliny oraz jej analogu hydroksylowego, natomiast ich struktury przedstawiono jako mieszaniny izomerów/diastereoizomerów. Czy w reakcji tworzenia sulfonamidowych pochodnych proliny obserwowano racemizację?
- 5) zastanawiająca jest zasadność użycia 3,5-krotnego nadmiaru aminy w procesie otrzymywania produktów **96a** i **96b** wobec dodatkowego czynnika zasadowego jakim był wodorowęglan sodu. Czy prowadzona była optymalizacja tego etapu?
- 6) jednym z parametrów określających potencjał związku jako kandydata do rozwoju przedklinicznego jest jego bezpieczeństwo. Czy prowadzona była ocena aktywności związków wobec prawidłowych, niezmiennych nowotworowo linii komórkowych (nie dostrzegam tego typu wyników z ocenianej rozprawie) oraz wpływ związków przykładowo na linie hepatocytów, czy obraz krwi?
- 7) w jaki sposób przygotowywano próbki związków do badań? Czy na etapie projektowania szacowano rozpuszczalność związków?
- 8) czy istnieją przesłanki strukturalne wskazujące, aby wyselekcjonowane związki poddać ocenie aktywności wobec „tradycyjnych celów biologicznych” takich jak mikrotubule, enzymy o cechach kinaz tyrozynowych/serynowo-treoninowych, czy kinaz zależnych od cyklin?

Rozprawę mgr Anna Szymanowska kończy podsumowaniem dorobku naukowego. Doktorantka jest współautorem jednego patentu przyznanego przez Urząd Patentowy RP, 1 zgłoszenia międzynarodowego i 1 zgłoszenia krajowego. Ponadto jest ona współautorką 9 publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania IF, wynoszącym 26,146 i łącznej liczba punktów MNiE 647. Większość prac została opublikowana w wydawnictwach z otwartym dostępem, a Doktorantka jest pierwszym lub drugim współautorem. Świadczy to o znaczącym wkładzie w powstanie prac. Spośród zaprezentowanego dorobku, trzy prace są bezpośrednio związane z rozprawą i dotyczą badań chemiczno-biologicznych (*Molecules*, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*) oraz przeglądu literatury, prezentującego ostatnie osiągnięcia w zakresie metod syntezy tytułowych związków (*Postepy Hig. Med. Dosw.*). Warto dodać, że mgr Anna

Szymanowska wygłosiła 3 komunikaty ustne i jest współautorką 26 krajowych i międzynarodowych doniesień konferencyjnych.

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytułach naukowych, w związku z czym zwracam się do Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Anny Szymanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Biorąc pod uwagę interdyscyplinarny charakter realizowanych badań, łączący preparatykę organiczną z zaawansowanymi badaniami biologicznymi nad ustaleniem molekularnego mechanizmu działania zsyntetyzowanych związków oraz merytoryczną wartość pracy, uważam, że warto wyróżnić przygotowaną przez Doktorantkę rozprawę. Wniosek o wyróżnienie uzasadnia wkład Doktorantki w chemię anelowanych pochodnych 1,2,4-triazyny oraz badania nad poszukiwaniem nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej. Dorobek mgr Anny Szymanowskiej, w szczególności aplikacyjny charakter badań potwierdzony współautorstwem patentu, 2 zgłoszeń patentowych oraz 7 publikacji z chemii medycznej i biologii molekularnej, o łącznym współczynniku oddziaływania 26,146, wykracza poza poziom wymagany na poziomie doktoratu. Zrealizowane badania w sposób właściwy wpisują się w aktualne trendy badań nad chorobami cywilizacyjnymi.

Kraków, 23.11.2021 r.


Katedra i Zakład
Chemii Organicznej UJ CM
prof. dr hab. Paweł Zajdel
kierownik

Prof. dr hab. Paweł Zajdel
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
✉ : pawel.zajdel@uj.edu.pl