



Bydgoszcz, 18.09.2020 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Angeliki Anny Adamus-Grabickiej pod tytułem

„Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem: synteza i badanie właściwości fizykochemicznych”.

Praca wykonana na Wydziale Farmaceutycznym

w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Elżbiety Budzisz

Poszukiwanie i synteza nowych związków o pożądanej aktywności farmakologicznej stanowi ciągle wyzwania dla naukowców i stanowi jeden z istotnych etapów poszukiwania nowych leków. Jest to również niezmiernie ważne nie tylko w aspekcie poszukiwania nowych skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków dla pacjenta, ale również w sytuacji obserwowanego wzrostu oporności wielolekowej drobnoustrojów czy nowotworów na obecnie stosowane chemioterapeutyki przeciwdrobnoustrojowe czy przeciwnowotworowe. Stąd synteza i analiza właściwości fizykochemicznych oraz ocena potencjalnej aktywności biologicznej/farmakologicznej prezentowanych nowych związków o potencjalnej aktywności w celu poszukiwania *new drug candidates* stanowi jeden z trendów współczesnych nauk farmaceutycznych, a przedłożona przez Panią mgr Angelikę Annę Adamus-Grabicką rozprawa doktorska znakomicie wpisuje we wspomniane powyżej zagadnienia współczesnej farmacji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, stanowi spójny tematycznie zbiór trzech prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2018-2020 w recenzowanych czasopismach naukowych (w tym dwóch w czasopiśmie z listy filadelfijskiej) o sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym **6,12** i **150** punktach ministerialnych. W dwóch publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem. W tym miejscu należy także dodać, że całkowity dorobek naukowy Doktorantki jest znacznie bogatszy, gdyż jest Ona współautorem łącznie 16 publikacji i monografii (w których w 10 z nich jest pierwszym autorem), a współczynnik oddziaływania tych prac wynosi **13,439** i **474 pkt.** MNiSW. Ponadto, wyniki uzyskanych przez Doktorantkę prac były również



prezentowane na wielu krajowych konferencjach czy sympoziach naukowych. Świadczy to, że Doktorantka jest nie tylko specjalistką w obszarze realizowania własnego doktoratu, ale ma znacznie szersze zainteresowania naukowo-badawcze.

Odnosząc się bezpośrednio do układu przedłożonej do oceny pracy doktorskiej, to należy stwierdzić, że praca składa się z części głównej stanowiącej rozprawę doktorską i części stanowiącej suplement do tejże rozprawy. Rozprawa doktorska obejmuje 90 stron i podobnie jak w klasycznych dysertacjach, zawiera spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, część teoretyczną, cel pracy oraz część eksperymentalną w której przedstawiono metodologię badawczą wykorzystaną w trakcie realizacji badań, część nazwaną najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej w której opisane zostały wyniki uzyskane w trakcie realizacji prac badawczych wraz z kopią publikacji wchodzących w skład cyklu. Ponadto, praca zawiera dyskusję wyników oraz wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury, a także wykazy rycin, grantów czy całkowitego dorobku naukowego Doktorantki. W związku z tym, że rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl trzech prac, które są pracami zbiorowymi, stąd w pracy Doktorantka zamieściła stosowne oświadczenia wszystkich współautorów opublikowanych prac naukowych. Natomiast, w części stanowiącej suplement do rozprawy doktorskiej, Doktorantka zamieściła swoje CV naukowe oraz ponownie kopie publikacji wchodzących w skład cyklu wraz z suplementami do tychże prac, co uważam za ciekawe rozwiązanie, gdyż w jednym dodatkowym dokumencie zebrano, umożliwiające bezpośrednią lekturę, pełne kopie wszystkich prac wchodzących w skład dysertacji stanowiącej osiągnięcie naukowe w ubieganiu się o stopień doktora.

Tym samym, stwierdzam, że układ pracy doktorskiej jest przejrzysty i nie budzi zastrzeżeń, a dodatkowo praca napisana jest z dużą dbałością zarówno o stronę merytoryczną i graficzną rozprawy, ale również o poprawny język i formę. Należy również podkreślić, że przedstawiona w pracy dyskusja, jednocześnie potwierdza dużą wiedzę Doktorantki, ale i świadczy o Jej dużym zaangażowaniu w tematykę objętą pracą doktorską.

Należy stwierdzić, że wyniki badań uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały już opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (dwie prace opublikowane w *Molecules* i jedna opublikowana w *Acta Crystallographica E - Crystallographic Communications*), dlatego jestem przekonany, że ich poprawność merytoryczna wraz z interpretacją, została już zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, dlatego też, jako recenzent z obowiązku dokonam



jedynie krótkiej analizy zawartości poszczególnych publikacji pod kątem ich spójności tematycznej oraz nowości naukowej.

Po zapoznaniu się z ich treścią z przekonaniem stwierdzam, że publikacje te zostały dobrze zaplanowane, a zarówno zakres zrealizowanych badań, ich dyskusja oraz wnioski w nich przedstawione są na wysokim poziomie pod względem merytorycznym, jak i edytorskim.

Cel badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej został jasno sprecyzowany i dotyczył syntezy nowych pochodnych pirazolin skondensowanych z pierścieniem chromanonu lub flawanonu wraz z potwierdzeniem ich struktury chemicznej oraz zbadaniem ich właściwości fizykochemicznych, jak również określeniem wybranych aktywności biologicznych (erytrotoksyczności, cytotoksyczności czy zdolności do wiązania z albuminą), ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwnowotworowej w kontekście oddziaływania z DNA i wpływu na cykl życiowy komórek nowotworowych.

Doprecyzowując, aby zrealizować założone cele Doktorantka zaplanowała i wykonała szereg prac w ramach trzech dobrze zaplanowanych głównych etapów, określonych słusznie jako etap chemiczny, biologiczny oraz teoretyczny. W ramach etapu chemicznego, Doktorantka zsyntetyzowała 14 nowych pochodnych *E*-3-benzylideno-chrom-4-onów i *E*-3-benzylideno-2-fenylchroman-4-onów oraz 3-spiro-1-pirazolin skondensowanych z pierścieniem 3-benzylideno-chromanonu lub 3-benzylideno-flawanonu, dla których przeprowadziła badania analizy strukturalnej z wykorzystaniem technik ¹H NMR, ¹³C NMR, IR i MS, jak również metodami dyfrakcji rentgenowskiej. Dla wybranych związków wyznaczyła również eksperymentalnie z użyciem RF-TLC parametr określający ich lipofilowość. Następnie poszczególne grupy związków zostały poddane badaniom biologicznym, w których określono ich aktywność cytotoksyczną *in vitro* w stosunku do ludzkich komórek różnych typów nowotworów, a także określono wpływ związków na morfologię erytrocytów czy zdolność do wywoływania przez nie hemolizy (erytrotoksyczności). W ramach etapu badań biologicznych, określona została również zdolność wybranych związków do oddziaływania z DNA, a także wpływ na cykl życiowy komórek nowotworowych, co jest niezmiernie istotne w kontekście postulowanej dla tych związków aktywności przeciwnowotworowej. Natomiast, w ramach etapu badań teoretycznych, Doktorantka wyznaczyła metodami *in silico* teoretyczne parametry lipofilowości dla wybranych związków, a także powinowactwo do albuminy ludzkiej z wykorzystaniem dokowania molekularnego do miejsca wiązania związku jako liganda do tego białka. Na podstawie tak uzyskanych wyników, Doktorantka przeprowadziła analizę SAR, zależności pomiędzy strukturą analizowanych



związków (3-benzylideno-4-onów i 3-benzylideno-2-fenylchroman-4-onów oraz 3-spiro-1-pirazolin), a ich wyznaczoną aktywnością biologiczną.

Na podstawie uzyskanych wyników obszernych badań, Doktorantka sformułowała poprawnie wnioski podsumowujące najważniejsze osiągnięcia odpowiadające założonemu celowi pracy. Doktorantka w swoich badaniach wykazała m.in., że otrzymane związki charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością cytotoksyczną wobec różnych typów nowotworowych linii komórkowych, z największą aktywnością wobec ostrej białaczki promielocytarnej, jak również, że pochodne pirazoliny skondensowane z flawanonem wykazują większą aktywność przeciwnowotworową *in vitro* niż pirazoliny skondensowane z chromanem. Uzyskane rezultaty pokazały również, że obecność skondensowanego pierścienia pirazolinowego może odgrywać kluczową rolę w aktywności związków oraz że pozycja podstawników w pierścieniu fenolowym spiroflawanonów ma istotny wpływ na cytotoksyczność związków. Doktorantka potwierdziła również, że wybrane związki wykazują zdolność do oddziaływania z DNA, a także wykazują istotny wpływ na zahamowanie cyklu życiowego komórek nowotworowych w fazie G₂/M, co zgodnie z danymi literaturowymi wskazuje, że wykazana aktywność przeciwnowotworowa *in vitro* na liniach komórkowych związana jest z mechanizmem działania opartym o interkalację do i/lub alkilację DNA. Dodatkowo, uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują na potencjalną erytrotoksyczność badanych związków w warunkach *in vivo*, czy na zależność pomiędzy lipofilowością związków, a ich specyficzną zdolnością do wiązania z albuminą, co jest ważną informacją w aspekcie farmakokinetyki i farmakodynamiki tych związków.

W podsumowaniu części badawczej dodam, że wszystkie przeprowadzone w ramach osiągnięcia badania dotyczące syntezy nowych pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanem lub flawanonem wraz z wykonaną analizą aktywności biologicznej i właściwości fizykochemicznych obrazujące wpływ struktury otrzymanych związków na potencjalną aktywność farmakologiczną, należy uznać za nowatorskie, a wyniki badań zawarte w recenzowanej rozprawie doktorskiej, reprezentują wysoki poziom i wnoszą twórczy wkład do szeroko rozumianej wiedzy w zakresie syntezy nowych analogów flawonoidów jako potencjalnych struktur wiodących do poszukiwania chemoterapeutyków o zakładanej aktywności farmakologicznej (przeciwnowotworowej).



Generalnie, odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej trudno w tej pracy znaleźć słabe strony. Z obowiązku recenzenta, muszę jednak zwrócić uwagę na niewielkie niedociągnięcia językowe i edytorskie w tym nieliczne tzw. literówki, jak np.:

- w wykazie stosowanych skrótów zabrakło rozwinięcia dla pojawiającego się w pracy skrótu CHS - syntaza chalkonu;
- w spisie treści tytuł w pkt. IV.1.1. „Lipofilowość jako parametr aktywności biologicznej związków” wskazuje na niefortunny skrót myślowy, gdyż lipofilowość z definicji nie jest parametrem czy miarą wyrażającą aktywność biologiczną związków, aczkolwiek ma istotne znaczenie dla aktywności biologicznej związków w aspekcie ich zdolności do przenikania przez błony/bariery biologiczne;
- na stronie 20 jest zapis „...została poddana wątpliwości...”, a powinno być „...została poddana w wątpliwość...”;
- na stronie 39 jest zapis „...W prawidłowo dzielących się komórkach punkty kontrolne hamują progresję cyklu komórkowego...”, a powinno być „...W prawidłowo dzielących się komórkach w punktach kontrolnych cyklu komórkowego dochodzi do hamowanie jego progresji...”;
- na stronie 48, Doktorantka wskazuje, że związek 2 jest ośmiokrotnie bardziej cytotoksyczny na komórkach HL-60 niż 3-benzylidenoflawonon, podczas gdy wg wartości zawartych w Tabeli 3 w Publikacji 1 różnica ta jest około czterokrotna.

Powyższe uwagi nie wpływają jednak na całościową, pozytywną, ocenę pracy doktorskiej.

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań, na które o udzielenie odpowiedzi chciałbym prosić Doktorantkę podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Mianowicie, dlaczego do wyznaczania eksperymentalnego parametru lipofilowości związków użyła akurat metody RF-TLC, a nie np. RF-HPLC czy innej, a do wyznaczania zdolności związków do oddziaływania z DNA wykorzystała akurat metodę nazwaną jako „trawienie plazmidowego DNA”, a nie np. metodę wypierania fluorochromów czy metodę opartą o pomiar „topnienia DNA” i wykorzystała jedynie tylko tą jedną metodę pozwalającą w sposób pośredni określić zdolność związków do oddziaływania z DNA?

Chciałbym również zapytać Doktorantkę, czy na podstawie uzyskanych a prezentowanych w rozprawie wyników, w tym zależności struktura-aktywność dla analizowanych związków, planuje syntezę nowych związków jako potencjalnych struktur wiodących do poszukiwania chemoterapeutyków o zakładanej aktywności przeciwnowotworowej?



Wnioski końcowe

Reasumując, w podsumowaniu stwierdzam, że nie mam żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Anny Adamus-Grabickiej, pt. *„Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem: synteza i badanie właściwości fizykochemicznych”* jest pracą nowatorską, wartościową i stanowi oryginalny i twórczy wkład w poszukiwaniu i syntezie nowych związków chemicznych o potencjalnej aktywności biologicznej/farmakologicznej, czego dowodem jest fakt, otrzymania przez Doktorantkę szeregu nowych pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem jako potencjalnych kandydatów na leki o aktywności przeciwnowotworowej.

W związku z powyższym przedstawiona dysertacja spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem wnioskuję i proszę Wysoką Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Angeliki Anny Adamus-Grabickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk farmaceutycznych.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie

Oceniana praca wnosi istotny twórczy wkład w rozwój nauk farmaceutycznych związanych z poszukiwaniem nowych związków z grupy pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem o potencjalnej aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej). Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w formie trzech prac oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych, a w dwóch z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny IF publikacji będących podstawą dysertacji wynosi 6,12 a punktacja ministerialna 150 pkt.

KIEROWNIK
Katedry Toksykologii i Bromatologii

dr hab. Marcin Koba, prof. UMK