

Wydział Farmaceutyczny
Zakład Farmacji Szpitalnej
ul. Muszyńskiego 1 90-151 Łódź
Prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak
tel. 42 677 92 52
tel. kom. 607 776 095
e-mail: andrzej.stanczak@umed.lodz.pl

Łódź, 26.05.2015

OCENA

dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr farm. Katarzyny Błaszczak-Świątkiewicz w związku z postępowaniem habilitacyjnym.

1. Dane biograficzne

Dr n. farm. Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz jest absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi. Tytuł magistra farmacji uzyskała w 1997 roku. Po ukończeniu studiów rozpoczęła pracę na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Łodzi. Aby nie tracić kontaktu z zawodem podjęła równocześnie pracę w aptece, a w 2000 roku uzyskała stopień specjalisty z zakresu farmacji aptecznej. W 2005 roku obroniła pracę doktorską pod tytułem „Nowe pochodne chinazoliny o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej”, która to praca została wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi. Następnie od 2006 roku została zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Analizy Leków i Radiofarmacji, Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, gdzie pracuje do chwili obecnej.

W latach 2014 – 2015 brała udział w szkoleniach w ramach programów ERASMUS STAFF TRAINING MOBILITY w Uniwersytecie w Wolverhampton (Anglia), oraz na Uniwersytecie

w Lisbonie, (Portugalia), oraz Individual Fellowships w ramach Programu Europejskiego H2020-Msca-If.

2. Ocena działalności naukowej

2.1 Ocena dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych stanowi cykl prac w tym : 4 publikacje oryginalne, 1 publikacja przeglądowa oraz patent (zgłoszenie patentowe nr 331670, 2000), a także 9 wystąpień zjazdowych. (IF 2,314; 54 pkt. MNiSW).

Tematyką dorobku naukowego w tym okresie było poszukiwanie nowych selektywnych leków przeciwnowotworowych . Głównym przedmiotem zainteresowania stały się leki wykorzystujące fakt niedotlenienia środowiska guza nowotworowego jako punkt uchwytu działania związków z grupy potencjalnych czynników bioredukcyjnych. Habilitantka skoncentrowała się na pochodnych chinazoliny, syntetyzując szereg pochodnych chinazoliny, które wykazały aktywność cytotoksyczną klasyfikowaną pomiędzy mitomycyną C a misonidazolem , których budowę i sposób działania zostały zastrzeżone patentem. Ponadto dla otrzymanych związków opracowała metody analityczne w tym chromatografii cienkowsarstowej TLC, określając trwałość tych związków w środowisku badań biologicznych metodą HPLC. Także w tym okresie przedmiotem zainteresowania stały się również radiofarmaceutyki, co stanowiło drugi kierunek rozwijanych badań. Nową tematyką stało się poszukiwanie potencjalnych ligandów przeznaczonych do kompleksowania technetu, celem pozyskania nowych radiofarmaceutyków przeznaczonych do obrazowania czynności różnych narządów. Efektem tych poszukiwań były związki o charakterze zasad Schiffa, będące ligandami dla radiofarmaceutyków w pracach badawczych prowadzonych w Ośrodku Badań Jądrowych POLATOM Otwock-Świerk.

2.2 Ocena dorobku naukowego stanowiącego podstawę habilitacji.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych i podjęciu się projektu naukowego pt. „ Poszukiwanie nowych strategii terapii przeciwnowotworowej w aspekcie

znoszenia lekooporności” Habilitantka dokumentuje swoją pracę naukową 9 pracami doświadczalnymi, 3 pracami przeglądowymi, licznymi wystąpieniami na konferencjach międzynarodowych i krajowych, oraz zgłoszeniem patentowym nr 395184 dokonany w roku 2012. W podanych 9 pracach Habilitantka jest pierwszym autorem z dominującym udziałem własnym (60%-90%).

Łączny współczynnik wpływu IF i punktacja wg MNiSW wynoszą odpowiednio: 13,4 i 190 pkt. Natomiast liczba cytowań wg. różnych źródeł wynosi od 14-29, a indeks Hirscha 3.

Inspiracją dla poszukiwania nowych pochodnych o działaniu przeciwnowotworowym były zarówno doniesienia piśmiennictwa jak i wcześniejsze jej badania. Koncepcja prezentowanych przez Habilitantkę badań dotyczyła działania przeciwnowotworowego związków z wykorzystaniem ich właściwości bioredukcyjnych. Tego typu pochodne wykazują wysoką selektywność w stosunku do komórek w stanie głębokiego niedotlenienia. Wspomniana hipoksja to obiecujący punkt uchwytu terapii przeciwnowotworowej. Podążając za tą ideą Habilitantka postanowiła zaprojektować i otrzymać nowe związki heterocykliczne z grupy bioredukcyjnych proleków, oraz poddać ocenie oraz porównaniu ich molekularne mechanizmy biologicznego działania ze szczególnym uwzględnieniem badań w środowisku ubogotlenowym.

W ramach dobrze zaplanowanych badań dr Błaszczak-Świątkiewicz otrzymała szereg pochodnych benzimidazolu, benzimidazol-4,7-dionu, N-tlenku benzimidazolu, N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu i poddała optymalizacji warunki ich otrzymywania. Realizację wyznaczonych celów projektu rozpoczęła od otrzymania pochodnych (N-metylideno)-o-fenyleno-diaminy, pochodnych benzimidazolu oraz N-tlenku benzimidazolu, a następnie pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu i ich analogów o strukturze N-tlenku. Zaplanowane pochodne benzimidazolu zostały otrzymane na drodze dwóch różnych syntez, mianowicie w wyniku bezpośredniej i pośredniej kondensacji. W wyniku bezpośredniej cyklokondensacji pochodnej 2-fenylenodiaminy z aldehydami piperonalem, aldehydem naftoesowym, 2-nitrobenzaldehydem, 4-chlorobenzaldehydem oraz 2-karboksybenzaldehydem uzyskała zaplanowane pochodne benzimidazolu. Te same pochodne benzimidazolu Habilitantka zsyntezowała poprzez cyklizację związków pośrednich o charakterze zasad Schiffa tj. pochodne (N-metylideno)-2-fenylenodiaminy. Ponadto w dalszych etapach pracy udowodniła, że otrzymywanie pochodnych N-tlenku benzimidazolu jest możliwe na drodze bezpośredniej reakcji utleniania pochodnych benzimidazolu roztworem perhydrolu w środowisku bezwodnego kwasu octowego.

Jednorodność chemiczną otrzymanych pochodnych potwierdziła metoda chromatografii HPTLC F254. Strukturę otrzymanych związków potwierdziła analiza elementarna i spektroskopowa: ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS.

W ramach swoich badań ustaliła struktury produktu pośredniego (zasady Schiffa) w syntezie pochodnych benzimidazolu, oraz udowodniła struktury chemiczne produktów cyklokondensacji tj.: pochodnych benzimidazolu na drodze badań krystalograficznych.

Reasumując, w wyniku przeprowadzonych syntez Habilitantka:

1. otrzymała 14 nowych pochodnych benzimidazolu oraz 8 nowych pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu
2. ustaliła warunki reakcji utleniania pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu do N-tlenku benzimidazolu względnie N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu
3. wyizolowała produkt pośredni towarzyszący syntezie benzimidazoli celem potwierdzenia możliwości otrzymania produktów finalnych poprzez cyklizację wcześniej izolowanej zasady Schiffa
4. potwierdziła budowę wszystkich otrzymanych heterocyklicznych układów kompleksową analizą strukturalną
5. w wyniku badań krystalograficznych ustaliła przestrzenną budowę pierścienia benzimidazolu ze szczególnym zwróceniem uwagi na fakt występowania wiązania NH w pierścieniu imidazolu w konformacji *trans* i *cis* w stosunku do grupy nitrowej. Dla wybranych pochodnych dokonała analizy ich trwałości celem ustalenia optymalnego czasu niezbędnego do przeprowadzenia testów *in vitro* z udziałem pochodnych benzimidazolu oraz N-tlenku benzimidazolu.

W części analitycznej swoich badań określiła trwałość wyizolowanych pochodnych benzimidazolu metodą HPLC po wcześniejszej walidacji i optymalizacji układu chromatograficznego. Wysoki stopień odzysku oraz długi okres półtrwania pochodnej benzimidazolo-4,7-dionu w zastosowanych rozpuszczalnikach dowiodły trwałości tej struktury.

W ramach badań biologicznych Habilitantka zaplanowała i wykonała:

- analizę aktywności wybranych pochodnych celem ustalenia ich wpływu na stopień rozplątania helisy DNA
- ocenę *in vitro* molekularnych mechanizmów działania wyizolowanych pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu na wybranych liniach komórkowych:
- testy antyproliferacyjne celem określenia aktywności cytotoksycznej wszystkich czterech grup związków

- testy z użyciem enzymu kaspazy 3/7 celem określenia rodzaju cytotoksycznego działania wszystkich czterech grup struktur chemicznych w aspekcie apoptozy względnie nekrozy
- testy na uszkodzenie struktury DNA celem zaproponowania potencjalnego przeciwnowotworowego mechanizmu działania wszystkich czterech grup związków heterocyklicznych
- analizę porównawczą aktywności biologicznej testowanych pochodnych benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu.

Otrzymane wcześniej pochodne posłużyły dr Błaszczak-Świątkiewicz do oceny aktywności benzimidazolu i benzimidazolo-4,7-dionu jako potencjalnych inhibitorów topoizomerazy I w teście z użyciem bromku etydyny jako markera stopnia relaksacji DNA. Stopień inhibicji topoizomerazy oznaczyła Habilitantka metodą fluorymetryczną. Podstawą oznaczeń była intensywność fluorescencji bromku etydyny, która wzrasta po połączeniu się z łańcuchem DNA. W porównaniu aktywności pochodnych benzimidazolu w stosunku do aktywności pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu w obu zastosowanych stężeniach (0,1 µg/mL oraz 0,5 µg/mL) wyższy stopień inhibicji wykazały pochodne benzimidazolo-4,7-dionu, w stężeniu 0,1 µg/mL związki te przewyższyły aktywnością kamptotecynę. Badania zależności aktywności od struktury wykazały, że N-tlenek 2-(2-nitrofenyleno)benzimidazolo-4,7-dionu posiada największą zdolność do inhibicji topoizomerazy I.

Wyniki przeprowadzonych przez Habilitantkę testów dostarczyły interesujących i obiecujących spostrzeżeń, a mianowicie cztery pochodne benzimidazolu wykazały aktywność cytotoksyczną w warunkach normotlenowych, a trzy z nich posiadają wyższą aktywność cytotoksyczną w warunkach hipoksji.

W dalszych badaniach Habilitantka przeprowadziła test późnej apoptozy zależnej od kaspazy 3/7, który dowiódł, iż pochodne benzimidazolu w testowanych stężeniach w warunkach normoksji powodują zahamowanie wzrostu komórek linii A549, raczej na drodze zahamowania ich proliferacji bez wpływu na proces apoptozy.

Porównując wpływ badanych związków i tirapazaminy jako substancji referencyjnej na integralność błony erytrocytarnej, dr n. farm. Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz stwierdziła, że nowo zsyntetyzowane związki wykazują słabe działanie niepożądane na błonę komórek erytrocytarnych. Wyniki testu erytrotoksyczności potwierdziły, że nowo zsyntetyzowane związki wykazywały niższą toksyczność niż substancje referencyjne, co może mieć korzystne znaczenie w przypadku dalszych badań tych związków na zwierzętach.

Kolejne badania tych pochodnych w warunkach hipoksji wykazały wyższy poziom uszkodzenia łańcucha DNA niż w normoksji. Wyniki doświadczeń potwierdziły aktywność

cytotoksyczną pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu względem obu linii komórkowych zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji.

Porównanie aktywności obu badanych grup związków wskazały jednoznacznie, że zdecydowanie najlepsze właściwości cytotoksyczne posiadają pochodne N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu oraz N-tlenku benzimidazolu. Te dwie grupy pochodnych o strukturze N-tlenku charakteryzują się wysoką selektywnością do komórek nowotworowych w stanie niedotlenienia co potwierdził wysoki poziom uszkodzenia struktury DNA w warunkach hipoksji w stosunku do poziomu uszkodzenia struktury DNA w warunkach normoksji oraz zdecydowanie większy odsetek umieralności komórek nowotworowych na drodze zaprogramowanej apoptozy w warunkach hipoksji niż normoksji.

Najlepsze właściwości antyproliferacyjne w korelacji normoksja/hipoksja wykazał związek **6b**, którego współczynnik cytotoksyczności O/H wyniósł 4,31, co klasyfikuje ten związek na poziomie aktywności zbliżonej do referencyjnej tirapazaminy. Zastosowany test na apoptozę wykazał, że badane pochodne benzimidazolo-4,7-dionu sprzyjają apoptozie komórek zarówno w warunkach normotlenowych jak i niedotlenienia.

Podsumowując badania biologiczne Habilitantki można powiedzieć, że pochodne benzimidazolu, a w szczególności pochodne benzimidazolo-4,7-dionu zasługują na uwagę jako potencjalne substancje przeciwnowotworowe. Wykazane właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek A549 i WM115 potwierdziły i powiększyły dotychczasową wiedzę na temat aktywności tych związków i możliwości ich wykorzystania jako czynników istotnych w pokonaniu bariery lekooporności guzów litych. Nowym spojrzeniem w tej materii jest fakt zastosowania pochodnych benzimidazolo-4,7-dionu, a zwłaszcza pochodnych N-tlenku benzimidazolo-4,7-dionu jako potencjalnych bio redukcyjnych proleków. Dlatego też pochodne benzimidazolo-4,7-dionu są nową, interesującą klasą związków, a ich właściwości stanowią dalsze wyzwanie naukowe w aspekcie ich zastosowania w terapii genowej z wykorzystaniem wektora adenowirusa kodującego nitroreduktazę niezbędną do aktywacji cytotoksycznych metabolitów.

Badania wykonane w czasie realizacji pracy habilitacyjnej mają a charakter multidyscyplinarne. Wykonanie tych wszystkich badań wymagało nie tylko szerokiej wiedzy z zakresu chemii organicznej, chemii medycznej czy badań biologicznych. W swoich badaniach Habilitantka mogła wykazać się umiejętnościami posługiwania skomplikowanymi metodami analitycznymi w tym: HPLC, UPLC, ^1H , NMR, ^{13}C NMR, IR oraz MS. Ponadto opanowała szereg metod określania aktywności biologicznej.

W ramach swojej działalności naukowej dr Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz współpracowała z Ośrodkiem Radioizotopów POLATOM Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Zakładem Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Instytutu Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej, Zakładem Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Department of Pharmaceutical Chemistry and Therapeutics of the University of Lisbon (Portugalia) i Research Institute in Healthcare Science University of Wolverhampton (Wielka Brytania).

Rozwój naukowy Habilitantki jest udokumentowany publikacjami w międzynarodowych i krajowych czasopismach z dziedziny farmacji medycznej. Opublikowała siedemnaście prac o łącznym współczynniku wpływu IF 15,714 i punktacji wg MNiSW wynoszącej 244 pkt. Swoje doświadczenie i zdobytą wiedzę prezentowała także na międzynarodowych konferencjach w kraju i za granicą.

3.Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej.

Dr hab. Błaszczak-Świątkiewicz posiada także poważne osiągnięcia dydaktyczno-organizacyjne. Od 1997 roku prowadzi zajęcia dydaktyczne w ramach przedmiotu chemia leków oraz fakultety związane z promocją zdrowia. Prowadzi specjalistyczne zajęcia z zakresu analizy strukturalnej środków farmaceutycznych, analizy jakościowej i ilościowej chemioterapeutyków, analizy chromatograficznej leków. Jest opiekunem naukowym studentów działających w kole naukowym w Zakładzie Chemii Leków. Była opiekunem 14 prac magisterskich. Jest także opiekunem stażystów w ramach swojej pracy w aptece. Dr hab. Katarzyna Błaszczak prowadzi także zajęcia na studiach podyplomowych i w ramach specjalizacji aptecznej. Rozwijając swoje zainteresowania zawodowe uczestniczyła w dwóch stażach naukowych (Anglia, Portugalia). Kandydatka jest recenzentem prac naukowych w szeregu impaktowanych czasopismach takich jak: *Journal of Cancer Research & Therapy*, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *Medicinal Chemistry Research*. W ramach praktyki zawodowej posiada specjalizacje z farmacji aptecznej, oraz szereg kursów i szkoleń z zakresu chromatografii, zarządzania jakością, metodyki nauczania, testów komórkowych czy nanomateriałów.

Kandydatka była uczestnikiem wielu programów europejskich (ERASMUS STAFF TRAINING MOBILITY) oraz innych programów krajowych. Brała aktywny udział

konferencjach międzynarodowych i krajowych prezentując wyniki swoich prac. Była trzykrotnie laureatem nagród rektorskich.

4. Podsumowanie

Reasumując, oceniany dorobek Pani dr Katarzyny Błaszczak-Świątkiewicz jest spójny zwłaszcza w obszarze prac zgłoszonych jako postępowanie habilitacyjne. Kierunek prowadzonych badań jest zgodny z aktualnymi potrzebami społecznymi związanymi z poszukiwaniem nowych związków o potencjalnym działaniem przeciwnowotworowym. Wartość naukowa publikacji wyrażona wartością współczynnika IF i MNIŚW po doktoracie jest wyższa niż przed doktoratem co wskazuje na dynamiczny rozwój naukowy Habilitantki. Należy podkreślić, że dorobek Habilitantki oprócz wartości naukowych posiada także znaczenie aplikacyjne, co może zostać praktycznie wykorzystane w leczeniu nowotworów.

W mojej opinii dr n. farm Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz spełnia warunki formalne i zwyczajowe stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych. Jej dorobek spełnia warunki określone w art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych i z pełnym przekonaniem wnioskuje o dopuszczenie Pani dr farm. Katarzyny Błaszczak-Świątkiewicz do kolejnego etapu przewodu habilitacyjnego.

KIEROWNIK
Zakładu Farmacji Szpitalnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. farm. Andrzej Stańczak