

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Medycznej,
Instytut Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, 10 sierpnia 2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Agnieszki Zajdy pt.: „*Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej.*”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem Pani dr hab. n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, prof. uczelni.

Temat pracy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i niezwykle ciekawy. Pani Zajda skupia się bowiem na możliwościach leczenia cukrzycy przy zastosowaniu nowych analogów metforminy. Obecnie zapadalność na cukrzycę typu 2 staje się epidemią. Przewlekła hiperglikemia wywiera bezpośredni toksyczny wpływ na różne typy komórek, w tym komórki β trzustki i komórki śródbłonna naczyń. Komórki śródbłonna są bezpośrednio narażone na toksyczne działanie wysokiego poziomu glukozy i związanego z nim stresu oksydacyjnego, co prowadzi do mikro- i makro- dysfunkcji układu naczyniowego, inicjując rozwój powikłań cukrzycy w przebiegu wielonarządowym, które znacząco wpływają na długość i jakość życia pacjentów. Stan insulinooporności poprzedzający objawową cukrzycę typu 2 (T2DM) jest bardzo niebezpieczny dla komórek β . Jednym z najważniejszych leków stosowanych w stanie przedcukrzycowym, w leczeniu T2DM, zwłaszcza ze współistniejącą nadwagą, jest metformina. Metformina, pochodna biguanidu, powszechnie stosowana jako środek

hipoglikemizujący, hamuje proliferację komórek w kilku ludzkich nowotworach złośliwych, w tym trzustki, tarczycy, raku żołądka, endometrium i jajniku. Ponadto, metformina eliminuje nowotworowe komórki macierzyste, przyczyniając się tym samym do lepszego rokowania pacjentów. Metformina wykazała znaczną synergię z chemioterapeutykami zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, w tym z cisplatyną, gefitynibem, sorafenibem, ewerolimusem czy trastuzumabem. Mechanizmy działania metforminy są wielokierunkowe i złożone. Metformina m.in. indukuje apoptozę, hamuje angiogenezę i przerzutowanie komórek nowotworowych. Lek aktywuje oksydazy mitochondrialne i zwiększa poziom reaktywnych form tlenu w obrębie macierzy mitochondrialnej poprzez hamowanie kompleksu pierwszego łańcucha oddechowego. Pacjenci leczeni metforminą wykazują zwiększone wskaźniki pięcioletniego przeżycia.

Celem nadrzędnym niniejszej rozprawy doktorskiej była synteza nowych sulfonamidowych pochodnych metforminy, a także analiza ich właściwości biologicznych względem komórek mięśni gładkich aorty (AoSMC) i śródbłonka żyły pępowinowej (HUVEC). Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Zajdy została przedstawiona w postaci cyklu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Cykl prac stanowiący podstawę postępowania doktorskiego, składa się z trzech publikacji (jednej przeglądowej oraz dwóch oryginalnych). Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Ponadto, zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami współautorów, Doktorantka miała wiodący udział w przygotowaniu omawianych publikacji. We wszystkich pracach Doktorantka zarówno projektowała, jak i wykonywała doświadczenia, analizowała wyniki, przygotowywała manuskrypt, poszukiwała i opracowywała bibliografie, co świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Autorki. Podkreślić należy, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR o wysokich współczynnikach wpływu oraz dużej liczbie punktów MEiN. Sumaryczna wartość współczynnika IF dla omawianych prac wyniosła 16.808.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Zajdy jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań, uwagę zwraca duża syntetyczność i przejrzystość, co

wynika z właściwiej przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Przedstawiona do oceny praca doktorska zawiera 232 strony. Autoreferat to około 103 strony. Jest podzielona na: wprowadzenie, cele naukowe rozprawy doktorskiej, część eksperymentalną, wyniki przeprowadzonych badań, dyskusję, podsumowanie osiągniętych wyników, wnioski końcowe, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo.

Zwarte merytorycznie **wprowadzenie** obejmuje 32 strony. Jest ono bardzo dobrze opracowane i stanowi uzupełnienie publikacji przeglądowej wchodzącej w skład cyklu. Złożone jest ono z podrozdziałów takich jak: patogeneza T2DM; zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy u pacjentów z T2DM (w tym zaburzenia hemostazy, hipofibrynoliza, układ czerwono krwinkowy); postępowanie przeciwzakrzepowe w T2DM; postępowanie w T2DM; metformina – przegląd historyczny, zastosowanie metforminy; struktura oraz właściwości fizykochemiczne i farmakokinetyczne metforminy; farmakogenetyka, farmakodynamika metforminy (w tym działanie hipoglikemizujące, kardioprotekcyjne właściwości metforminy); modyfikacje strukturalne szkieletu metforminy; repozycjonowanie leków oraz politerapia a leki o wielu celach. Doktoranka wykorzystała w sekcji wprowadzenie 13 starannie dobranych i bardzo estetycznie wykonanych rycin. We wstępie zamieszczono również tabele, w tym tab. nr 1.: porównanie leków obecnie najczęściej stosowanych w terapii T2DM oraz tab. nr 2.: dane oceniające wpływ metforminy na metabolizm, strukturę oraz funkcję serca. We wspomnianej części wprowadzającej, Pani mgr Agnieszka Zajda rzeczowo nakreśliła problematykę cukrzycy skupiając się na roli powszechnie stosowanej w terapii T2DM metforminy. Znalazł się też tutaj rzetelny opis obowiązujących standardów leczenia wraz z kompleksową charakterystyką metforminy i zestawieniem badań klinicznych oceniających skuteczność terapii. Doktorantka zwróciła uwagę na słabe strony leku, w tym na niską przenikalność związku przez błony biologiczne, co prowadzi do słabej absorpcji i ostatecznie do ograniczenia jego biodostępności.

Cel główny pracy oraz cele szczegółowe pracy badawczej opisane zostały w sposób wyczerpujący i klarowny. W etapie drugim Pani Zajda wymieniła aż dwanaście celów szczegółowych co w mojej opinii można było ograniczyć do kilku celów o mniejszym poziomie

szczegółowości zwłaszcza, że w tej części pracy znalazły się przejrzyste, bardzo dokładne schematy. Doktorantka skupiła swoją uwagę na profilu farmakokinetycznym i fizykochemicznym macierzystego leku. Należy podkreślić, że przedłożona do oceny praca realizowana była we współpracy międzynarodowej. Nawiązane zostało porozumienie z University of Eastern Finland, z zespołem Pani dr Kristiin Huttunen, który to zsyntetyzował nowe sulfonamidowe analogi metforminy. W celu uzyskania analogu metforminy o potencjalnym podwójnym działaniu, w tym o właściwościach hipoglikemizujących i przeciwzakrzepowych, jeden z bocznych atomów azotu w szkielecie metforminy podstawiono ugrupowaniem sulfonamidowym posiadającym w swojej strukturze grupę alkilową lub pierścień aromatyczny. Zbadano 14 nowych pochodnych metforminy. Struktura nowych analogów została zamieszczona w tabeli nr 3. Oceniono wpływ niniejszych związków na wybrane aspekty hemostazy, w tym parametry osocze i naczyniowe oraz układ krzepnięcia i fibrylizę.

Doktorantka wymieniła zastosowane **materiały** (osocze, erytrocyty, linie komórkowe w tym HUVEC i AoSMC) i metody badawcze. Należy zwrócić uwagę na szeroki panel technik badawczych wykorzystany w pracy. Z opisu rozprawy, treści oświadczeń współautorów i szacunkowego wkładu Doktorantki w powstanie prezentowanych artykułów wynika, że Autorka bardzo dobrze opanowała wiele różnych technik eksperymentalnych i ma duże doświadczenie w planowaniu i prowadzeniu badań.

W kolejnym rozdziale Pani mgr Agnieszka Zajda przedłożyła opis publikacji stanowiących podstawy pracy doktorskiej wraz z opisem uzyskanych wyników i wniosków. Wyniki nie pozostawiają wątpliwości, które z określonych różnic są istotne statystycznie.

Pierwszą z cyklu publikacji jest praca przeglądowa pt.: „Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data” opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie *Mechanisms of Ageing and Development*, która stanowi wyczerpujące opracowanie i przejrzyste ujęty przegląd prac naukowych, dotyczących metforminy, jej zastosowania jako substancji przedłużającej życie i poprawiającej stan zdrowia zwłaszcza u pacjentów w podeszłym wieku. Przeanalizowano molekularne

mechanizmy przeciwstarzeniowe metforminy, z uwzględnieniem jej wpływu na inicjację i progresję chorób układu sercowo-naczyniowego, chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworów. Okazała się być ona niezwykle skuteczna zwłaszcza u pacjentów z cukrzycą i nadciśnieniem. Metformina spełnia większość kryteriów substancji o funkcji geroprotektora. Zaprezentowany przegląd prac naukowych obejmuje 255 pozycji piśmienniczych, w tym dotyczących badań klinicznych i modeli *in vivo*, w przeważającej ilości z ostatniej dekady. Wysoka jakość pracy przeglądowej wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki i zainteresowanie tematem, co też stało się podwaliną pod pracę doświadczaną Pani Zajdy.

W kolejnej pracy z cyklu zatytułowanej: „*Structural Comparison of Sulfonamide-Based Derivatives That Can Improve Anti-Coagulation Properties of Metformin*” opublikowanej w roku 2022 w *International Journal of Molecular Sciences* (IF: 6.208), Pani mgr Agnieszka Zajda prowadziła badania nad serią 8 analogów metforminy. Oszacowała ich cytotoksyczność względem komórek linii HUVEC i AoSMC za pomocą testu WST-1. Wnioski wysunięte przez Doktorantkę wskazują, że alkilowe pochodne metforminy (związki nr 1–3) wykazują korzystny profil bezpieczeństwa zarówno w liniach komórkowych HUVEC, jak i AoSMC przy stężeniach do 3 $\mu\text{mol/mL}$. Zostało to potwierdzone poprzez ocenę integralności oraz funkcji barierowych komórek HUVEC przy wykorzystaniu ciągłego systemu analizy komórek w czasie rzeczywistym RTCA-DP. W pracy tej zbadano również zdolność komórek HUVEC do utylizacji glukozy w komórkach oraz właściwości przeciwzakrzepowe. Związki z łańcuchem alkilowym (nr 1–3), podstawnikiem trifluorometylowym (nr 4) lub grupą acetylową (nr 5) istotnie zwiększały wykorzystanie glukozy w ludzkich komórkach śródbłonna pępowiny (HUVEC), podobnie jak metformina. Do badań tych zastosowano fluorescencyjny analog glukozy 2-NBDG. Za pomocą testu rysy Doktoranka wykazała, że analog metforminy nr 5, jako jedyny w sposób umiarkowany hamował migrację komórek HUVEC po 24-godzinach inkubacji. Związki z łańcuchem alkilowym korzystnie wpływały na parametry krzepnięcia. Sulfonamidowe analogi metforminy (związki nr 1–5) zmniejszyły ilość uwalnianej proteazy serynowej t-PA z komórek HUVEC. Ponadto, pochodne nr 1-5 korzystnie wpływały

na aktywność czynnika X i antytrombiny III (AT). Związek 4 oraz 5 również wywierały korzystny wpływ na wydłużenie czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT) i czasu trombinowego (TT). Związki nr 1–5 poddano dalszym pogłębionym badaniom oceniając ich wpływ na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrylizy przy użyciu wieloparametrycznego modelu (CL-test). W przeciwieństwie do wyżej wymienionych analogów metforminy, pochodne 4 i 5 wywierały silniejsze działanie antykoagulacyjne, aczkolwiek okazały się być również bardziej cytotoksyczne w stosunku do komórek linii HUVEC. W ostatnim etapie badań oceniono wpływ nowych pochodnych metforminy na hemolizę i morfologię krwinek czerwonych. Doktorantka wykazała, że cyjanobenzenosulfonamidy (związki nr 6–8) nie wykazywały biozgodności. Pozostałe związki w zakresie stężeń: 0.006–1.5 $\mu\text{mol/mL}$ okazały się biozgodne. Doktorantka dowiodła, że nowo zsyntetyzowane sulfonamidy, posiadające podstawniki alkilowe, są pochodnymi metforminy o potencjalnym działaniu przeciwhiperglykemicznym i aktywności przeciwzakrzepowej.

Ostatnia z cyklu praca opublikowana została w roku 2023 w czasopiśmie *Chemico-Biological Interactions* pt.: „Substituent effects of sulfonamide derivatives of metformin that can dually improve cellular glucose utilization and anti-coagulation”. Ta praca ma również wysoki IF=5.168 oraz 100 pkt. MEiN. Stwierdzono, że wszystkie syntetyzowane o- i m-benzenosulfonamidy, a zwłaszcza pochodne z grupami nitrowymi tj. m-nitrobenzenosulfonamid (nr 3 w publikacji, a nr 11 w rozprawie) i aminowymi jak o-aminobenzenosulfonamid (związek nr 4 - nr 12 w rozprawie), charakteryzują się dobrym profilem bezpieczeństwa w komórkach HUVEC, jak i AoSMC, co zostało dodatkowo potwierdzone w badaniach integralności komórkowej. Analogi biguanidu z grupą metoksyłową (związki nr 1, 2 - rozprawa nr 9, 10) oraz pochodne metforminy z podstawnikiem aminowym (związki nr 5, 6 - nr 13 i 14 w rozprawie) istotnie zwiększały wykorzystanie glukozy w komórkach HUVEC, podobnie jak macierzysty lek. Związki 9, 11 i 14 korzystnie wpływały na parametry krzepnięcia. Analogi metforminy, związki nr 9–14, wydłużały zarówno czas APTT, jak i TT. Natomiast analogi nr 9, 11, 13 oddziaływały na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia, co zostało dodatkowo potwierdzone w teście

oceniającym aktywność czynnika X. Z kolei w obecności pochodnych nr 9, 11 i 14 odnotowano również wzrost aktywności parametru AT (antytrombina III). Test krzepnięcia wykazał, że aromatyczne pochodne nr 9, 11, 12, 14 wydłużają czas generowania endogennej trombiny, czas krzepnięcia osocza oraz zmniejszają początkową prędkość wykrzepiania osocza, co może być bezpośrednio powiązane z hamowaniem przez te związki amidolitycznej aktywności trombiny. Ponadto pochodna metforminy nr 9 spowalniała również proces polimeryzacji fibryny, wskazując korzystne właściwości antykoagulacyjne. Nowe analogi metforminy nie oddziaływały z dwuwarstwą lipidowo-białkową erytrocytów. Pochodna nr 3 (nr 11 rozprawa) ma wysoce pożądane właściwości przeciwkrzepliwie, a związki 1 i 6 (rozprawa związków nr 9 i 14) wykazują aktywność przeciwhiperглиkemiczną i przeciwwzkrzepową. Doktorantka podkreśliła, że modyfikacja szkieletu metforminy w benzenosulfonamid podstawiony ugrupowaniem aminowym w pozycji para w pierścieniu aromatycznym, skutkowała uzyskaniem związku nr 14 o najsilniejszym efekcie przeciwwzkrzepowym.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Zajdy zakończona została jasno i przejrzysto napisanymi **wnioskami**, które odpowiadają postawionej hipotezie oraz celom pracy. Doktorantka zawarła w nich omówienie najważniejszych wyników z opublikowanych prac. Podkreśliła, iż nowo zsyntetyzowane sulfonamidowe analogi metforminy zawierające podstawnik alkilowy lub pierścień aromatyczny sprzyjają utrzymaniu hemostazy osoczowej. Nowe pochodne wykazują zarówno właściwości przeciwhiperглиkemiczne, jak i silniejsze działanie przeciwwzkrzepowe niż metformina. Doktorantka dowiodła, że związki od 1 do 5 oraz od 9 do 14 nie są cytotoksyczne dla komórek HUVEC, AoSMC czy erytrocytów. Ponadto Doktorantka zauważyła, że na podstawie badań *in vitro* nie można przewidzieć właściwości nowych analogów metforminy w warunkach *in vivo*. Należy podkreślić, że Pani Zajda ma świadomość i potrzebę kontynuowania badań w warunkach *in vivo*, celem potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa nowych pochodnych metforminy. Wnioski wysunięte przez Doktorantkę mają w mojej ocenie bardzo ważny wymiar praktyczny i sugestie w nich

zawarte stanowią bazę do dalszych badań. Podsumowanie wyników przeprowadzonych przez Doktorantkę badań jest prawidłowe i nie budzące zastrzeżeń. Doktorantka logicznie wiąże swoje obserwacje z piśmiennictwem. Autorka wykazała się w pracy bardzo dobrą znajomością poruszanej tematyki. Powołuje się Ona na 150 pozycji literaturowych, ułożonych w kolejności pojawiania się w tekście. W większości są to oryginalne prace anglojęzyczne, opublikowane w czasopismach o wysokim IF.

W podsumowaniu oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Agnieszki Zajdy została prawidłowo zaplanowana i przedstawiona pod względem metodycznym. Wyniki są spójne i odpowiadają postawionym celom. Rozprawa Pani mgr Zajdy napisana jest poprawnym językiem, praca jest estetyczna, a rysunki przejrzyste.

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

1. Uwagę zwraca rozbieżna numeracja związków między publikacją nr 3 a numeracją w rozprawie doktorskiej.
3. Pani mgr Agnieszka Zajda w rozdziale nr 2.: Hodowle komórkowe (HUVEC i AoSMC) pisze, że korzystała tylko z komórek do 4 pasażu. Poproszę o wyjaśnienie, dlaczego.
2. Jakie według Doktorantki są dalsze kierunki badawcze, w których sulfonamidowe analogi metforminy wyselekcjonowane dotychczas, mogłyby być wykorzystane?

Wniosek końcowy. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Zajdy pt.: „*Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej*” ma dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę na temat potencjału modyfikacji szkieletu metforminy w sulfonamidy zawierające pierścień aromatyczny. Praca zawiera elementy nowości naukowej, a także dowodzi umiejętności Doktorantki w zakresie planowania i przeprowadzenia badań naukowych oraz interpretacji uzyskanych wyników. Doktorantka wykazała się także bardzo dobrą znajomością literatury

przedmiotu. Praca ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie. Stwierdzam, że praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 187.1, punkt 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. **Z pełnym przekonaniem zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr farm. Agnieszki Justyny Zajdy do dalszych etapów postępowania doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Uzasadnienie:

Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, posiada elementy nowości naukowej oraz potencjał do kontynuacji podjętej tematyki badawczej. Zastosowanie modyfikacji metforminy jako strategii ukierunkowanej na wiele celów stanowi obiecującą alternatywę dla terapii skojarzonej. Doktorantka znacząco przyczyniła się do poszerzenia wiedzy na temat nowych sulfonamidowych analogów metforminy, które mogą być wykorzystywane w leczeniu cukrzycy, czy jako związki przeciwzakrzepowe. Należy podkreślić fakt, że Pani Zajda realizowała swoje badania w międzynarodowym zespole badawczym. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w trzech czasopismach znajdującym się na liście JCR (IF=16.808) oraz na liście czasopism punktowanych MEiN (sumaryczna liczba punktów - 340 pkt). W opublikowanych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, ponadto w każdej z przedłożonych do oceny prac miała wkład powyżej 50%.

załączam wyrazy szacunku

Aneta Rogalska

dr hab. Aneta Rogalska, prof. UŁ