

Katowice, 24.08.2023 r.

Katedra i Zakład Chemii
i Analizy leków

Wydział Nauk Farmaceutycznych
w Sosnowcu

Śląski
Uniwersytet Medyczny
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4
41-200 Sosnowiec
www.chemialekow.sum.edu.pl

Dr hab. n. farm.
Jakub Rok
jrok@sum.edu.pl
tel.: (+48 32) 364 15 47

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 16 11

Ocena rozprawy doktorskiej pt.:

**Analiza aktywności biologicznej nowych analogów
metforminy o budowie sulfonamidowej**

wykonanej przez

mgr farm. Agnieszka Zajdę

w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji,
Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

pod kierunkiem:

dr hab. n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, prof. uczelni

Cukrzyca jest jedną z głównych chorób cywilizacyjnych o globalnym zasięgu, stanowiąc tym samym wyzwanie dla współczesnej medycyny i farmacji. Aktualne dane wskazują, iż liczba osób chorujących na cukrzycę w Polsce przekracza 2 mln. Należy przy tym zaznaczyć, że blisko 25% chorych pozostaje niezdiagnozowanych, co przekłada się na ogromne ryzyko rozwoju powikłań, a nierzadko stanowi zagrożenie życia. Niestety, pomimo sporej wiedzy na temat przyczyn, objawów oraz skutków cukrzycy, a także podejmowanych akcji społeczno-edukacyjnych, szacuje się, iż w ciągu najbliższych 15 – 20 lat liczba chorych na cukrzycę ulegnie podwojeniu. Modele predykcyjne, na które powołuje się Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna, prognozują także ogromny wzrost liczby chorujących na cukrzycę w skali globalnej (około 783 milionów chorych w 2045 roku). W ostatnich latach opracowano i wprowadzono do terapii cukrzycy kilka nowych grup leków, m.in. flozyny, czyli inhibitory kotransportera 2 glukozy zależnego od jonów sodowych (SGLT2) oraz leki działające na układ inkretynowy: analogi glukagonopodobnego peptydu-1 i tzw. „gliptyny”, czyli inhibitory peptydazy dipeptydylowej 4 (DPP-4). Choć leki należące do wyżej wymienionych grup cechują



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

się relatywnie wysoką skutecznością oraz korzystnym profilem bezpieczeństwa, wciąż trudno mówić o prawdziwym przełomie w zakresie walki z cukrzycą. Od wielu lat, również i dziś, to metformina jest jednym z podstawowych i najważniejszych leków przeciwcukrzycowych. Jest ona pierwszym lekiem doustnym rekomendowanym do stosowania od momentu diagnozy cukrzycy typu 2. Metformina jest wykorzystywana zarówno w zakresie monoterapii, jak i w leczeniu skojarzonym, m.in. z flozynami, gliptynami lub insuliną. Jej złożony mechanizm działania przekłada się na plejotropową aktywność farmakologiczną, która wykracza poza wpływ na stężenie glukozy.

Pani Magister Agnieszka Zajda w ramach swojej pracy doktorskiej dokonała oceny działania 14 sulfonamidowych pochodnych metforminy, uwzględniając przy tym efekt hipoglikemizujący oraz wpływ na proces hemostazy. Wyniki swoich badań Doktorantka opublikowała w dwóch artykułach naukowych na łamach recenzowanych i renomowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym, tj. *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Chemico-Biological Interactions*. Sumaryczny wskaźnik Impact Factor tych dwóch publikacji wynosi 11,376, a łączna punktacja MEiN: 240. Dodatkowo, w ramach zbioru publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej znajduje się angielskojęzyczny artykuł przeglądowy podsumowujący liczne badania wskazujące na przeciwstarzeniowe właściwości metforminy. Praca została opublikowana w czasopiśmie *Mechanisms of Ageing and Development*, którego wskaźnik IF wynosi 5,432, a punktacja MEiN ma wartość 100. Uwzględniając epidemiologiczne tło cukrzycy, istotną rolę metforminy w farmakoterapii tej choroby, a także perspektywy opracowania nowych metod leczenia, należy bezsprzecznie stwierdzić, iż recenzowana rozprawa doktorska stanowi próbę rozwiązania aktualnych i niezwykle istotnych problemów z zakresu chemii leków i farmakologii. W moim przekonaniu, wybór tematu jest w pełni uzasadniony, zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i w kontekście aplikacyjności prowadzonych badań.

Rolę promotora pracy doktorskiej Pani magister Agnieszki Zajdy pełniła Pani dr hab. n. farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, prof. uczelni. Badania naukowe zostały przeprowadzone w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Katedry Chemii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W trakcie realizacji projektu korzystano ze środków statutowych macierzystej uczelni. W tym miejscu należy także podkreślić współpracę z University of Eastern Finland, gdzie dokonano syntezy analizowanych pochodnych metforminy. W związku z wykorzystaniem w pracach eksperymentalnych materiału biologicznego w postaci osocza i erytrocytów, zadbano o zgodę na badania Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi.

Układ przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest prawidłowy i spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom naukowym. W pracy znajduje się wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cele naukowe, opis stosowanych metod eksperymentalnych, wyniki wraz z dyskusją, podsumowanie oraz wnioski końcowe. W dalszej części zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim, kopie właściwych publikacji oraz oświadczenia Doktorantki oraz współautorów publikacji. Na końcu pracy znajduje się

podsumowanie dotyczące wykształcenia i dorobku Pani magister Agnieszki Zajdy. Jedynymi uwagami odnoszącymi się do struktury pracy jest brak wykazu tabel i rycin oraz brak numeracji wielopoziomowej odnoszącej się do poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów. Chciałbym jednocześnie zaznaczyć, iż są to uwagi o charakterze subiektywnym i nie wpływają na ogólną ocenę rozprawy.

Wprowadzenie rozprawy zostało opracowane na podstawie 128 publikacji i zaprezentowane na 33 stronach. Stanowi ono obszernie i szczegółowe omówienie zagadnień związanych z tematem pracy. W ramach wstępu teoretycznego Autorka opisała w szerokim zakresie patogenezę oraz terapię cukrzycy, zwracając przy tym szczególną uwagę na towarzyszące tej chorobie zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy. W dalszej części przedstawiono charakterystykę metforminy, obejmującą rys historyczny, właściwości fizykochemiczne, farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, a także zastosowanie kliniczne. Warto zaznaczyć, że przygotowując opracowanie teoretyczne, nie pominięto krytycznego spojrzenia na omawianą substancję leczniczą. Podkreślono w tym aspekcie m.in. działania niepożądane oraz istnienie wewnątrzosobniczej i międzyosobniczej zmienności w zakresie odpowiedzi na działanie leku, wskazując przy tym możliwe przyczyny tego zjawiska. Opis aktywności farmakologicznej metforminy nie ogranicza się do działania hipoglikemizującego. Autorka zwróciła także uwagę na właściwości kardioprotekcyjne i przeciwzakrzepowe. Bazując na przedstawionych informacjach, Pani magister Agnieszka Zajda omówiła możliwe kierunki modyfikacji struktury metforminy zmierzające do otrzymania pochodnych o korzystniejszych parametrach fizykochemicznych, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Podkreślono przy tym funkcję ugrupowania sulfonamidowego, które obecne jest w strukturze wielu aktualnie stosowanych leków o udokumentowanej aktywności farmakologicznej. Należy podkreślić, że najważniejsze informacje przedstawione w rozdziale „Wprowadzenie” zostały dodatkowo podsumowane na licznych, skrupulatnie przygotowanych schematach graficznych, które ułatwiają zrozumienie przekazanych treści. Podsumowując, uważam, że wstęp pracy został opracowany w sposób wyczerpujący oraz napisany poprawnie pod kątem merytorycznym i językowym. W całości stanowi gruntowne wprowadzenie w problematykę wykonanych badań.

Nadrzędnym celem niniejszej pracy było przeprowadzenie badań zmierzających do oceny aktywności biologicznej 14 nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej. Synteza nowych związków w głównej mierze miała na celu poprawę właściwości fizykochemicznych i farmakokinetycznych związku macierzystego z jednoczesnym zachowaniem wysokiej skuteczności farmakoterapeutycznej w leczeniu cukrzycy. Realizacja całego projektu została podzielona na 4 etapy, które obejmowały kolejno: a) analizę potencjału terapeutycznego metforminy jako środka przeciwstarzeniowego o plejotropowym działaniu, b) ocenę aktywności biologicznej badanych analogów metforminy, c) badania biozgodności zsyntezowanych substancji oraz d) analizę zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną pochodnych metforminy. W rozdziale zatytułowanym „Cele naukowe rozprawy doktorskiej” Autorka dodatkowo w sposób szczegółowy wypunktowała badania i analizy, które przyczyniły się do realizacji poszczególnych etapów projektu.

Analogicznie do rozdziału „Wprowadzenie”, przedstawione treści odnoszące się do realizacji zaplanowanych zadań zostały podsumowane na skrupulatnych i przemyślanych schematach graficznych.

W kolejnej części pracy znalazł się opis materiałów oraz metod badawczych wykorzystanych w trakcie realizacji projektu. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że Doktorantka zdecydowała się na prowadzenie badań zarówno z użyciem hodowli komórkowych, jak i materiału biologicznego pobranego od pacjentów, tj. osocza oraz erytrocytów. Pani magister wybrała do badań ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC) oraz ludzkie komórki mięśni gładkich aorty (AoSMC). Przeprowadzone analizy uwzględniały techniki oparte m.in. na pomiarach absorpcji i fluorescencji, turbidymetrii oraz obserwacji mikroskopowej. Panel eksperymentalny obejmował test żywotności i integralności komórek, analizę potencjału błon mitochondrialnych oraz migracji komórek, test utylizacji glukozy, badania uwalniania tkankowego aktywatora plazminogenu oraz aktywności antytrombiny III, czynnika X oraz amidolitycznej trombiny. W pracy wykonano ponadto oznaczenia koagulologiczne, a także test tworzenia skrzepu i fibrynolizy, test krzepnięcia po generacji endogennej trombiny oraz test lizy krwinek czerwonych oraz badanie morfologii erytrocytów. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem programów Statistica oraz GraphPad Prism. Szczegółowy opis ww. metod eksperymentalnych pozwala stwierdzić, że wszystkie badania wykonano prawidłowo. Duża różnorodność technik i metod badawczych wskazuje na wielokierunkowe i kompleksowe spojrzenie Doktorantki na kwestię rozwiązania problemu badawczego, co bezsprzecznie jest jednym z atutów niniejszej pracy. W mojej opinii zaplanowane badania zostały właściwie dobrane uwzględniając cel pracy oraz założenia oparte na wcześniejszych badaniach nad metforminą.

Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane i omówione na 19 stronach pracy doktorskiej, zgodnie z kolejnością realizacji poszczególnych etapów projektu. Opis wyników jest szczegółowy i rzeczowy. Doktorantka w tej części rozprawy nie tylko przedstawiła główne obserwacje oraz płynące z nich wnioski, ale przytoczyła także wartości uzyskanych wyników, wraz z rezultatami analizy statystycznej. W moim przekonaniu, na szczególną uwagę zasługuje opis etapu 4, czyli podsumowanie osiągniętych wyników w formie analizy zależności pomiędzy budową chemiczną a aktywnością biologiczną badanych analogów metforminy. Autorka przygotowując tę część pracy dokonała syntezy wyników oraz wniosków, skupiając się w szczególności na właściwościach cytotoksycznych oraz antykoagulacyjnych. Przeprowadzenie takiej analizy świadczy to dogłębnym zrozumieniu omawianej problematyki oraz dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na podstawie otrzymanych wyników Pani magister Agnieszka Zajda sformułowała wnioski końcowe wskazując m.in., że pochodne sulfonamidowe metforminy zawierające w swojej strukturze podstawiony układ aromatyczny, zwłaszcza w pozycji meta, wykazują silniejsze właściwości przeciwwskrzepowe w porównaniu z lekiem macierzystym. W ramach głównych konkluzji stwierdzono także, iż analogi o budowie sulfonamidowej zawierające podstawnik alkiłowy lub pierścień aromatyczny posiadają korzystniejszy wpływ na parametry hemostazy osoczowej w stosunku do

metforminy. Korzyści płynące z modyfikacji struktury wydają się szczególnie obiecujące w obliczu wyników wskazujących wstępnie na skuteczność przeciwcukrzycowego działania oraz bezpieczeństwo części z badanych pochodnych metforminy. W mojej opinii, wnioski są rzeczowe i podsumowują analizy uzyskanych wyników, wyznaczając jednocześnie kierunek kolejnych badań nad metforminą i jej pochodnymi.

Opierając się na teoretycznym opracowaniu poruszanych zagadnień oraz przedstawionym materiale wynikowym, korzystając jednocześnie z przywileju recenzenta, pragnę przedstawić kilka zagadnień, które mogą stanowić element dalszej dyskusji:

1. W trakcie realizacji badań nad pochodnymi metforminy Doktorantka wykorzystwała linie komórek ludzkich: śródbłonna żyły pępowinowej oraz mięśni gładkich aorty. Pojawia się zatem pytanie o kryteria, którymi kierowano się przy wyborze tych konkretnych linii komórkowych. Czy podczas planowania eksperymentów lub prowadzenia badań rozważano wykorzystanie innych linii komórkowych uwzględniając przy tym cel projektu?
2. Metformina jest lekiem wykazującym złożony mechanizm działania przeciwcukrzycowego. Powoduje m.in. wzrost aktywności kinazy białkowej aktywowanej AMP, hamuje kompleks I mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz obniża aktywność mitochondrialnej dehydrogenazy glicerolo-fosforanowej. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja molekularnych celów metforminy sprawia, iż niezwykle istotny w perspektywie działania i skuteczności leku jest transport dokomórkowy oraz odpowiedzialne za niego białka, co zostało podkreślone w pracy przy okazji charakterystyki farmakogenetycznej. Czy na podstawie danych literaturowych można scharakteryzować lub zaplanować pośrednie lub bezpośrednie badanie dokomórkowego transportu metforminy w przypadku badanych linii?
3. Biorąc pod uwagę aplikacyjny charakter pracy i obiecujące wyniki, prosiłbym Doktorantkę o przedstawienie kierunków przyszłych badań, które mogłyby być prowadzone w ramach kontynuowania realizacji projektu. Która lub które spośród badanych pochodnych metforminy zasługują na największą uwagę?

Podsumowując, pragnę stwierdzić, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Agnieszki Zajdy została starannie zredagowana oraz napisana w sposób szczegółowy i zgodny z zasadami redagowania tego typu publikacji. Doktorantka dokonała rzetelnego i gruntownego przeglądu literatury, co znalazło odzwierciedlenie w informacjach przedstawionych we wprowadzeniu oraz dyskusji. W mojej opinii przeprowadzone badania oraz zaprezentowane wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego odnoszącego się bezpośrednio do tematu niniejszej pracy. Należy także podkreślić, że kierunek badań wpisuje się w aktualny trend nauk farmaceutycznych oraz stanowi odpowiedź na potrzebę poszukiwania nowych, skutecznych metod leczenia chorób cywilizacyjnych, w tym cukrzycy.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że recenzowana praca w całości spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce

(Dz. U. 2023 poz. 742) i wnoszę wniosek do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani magister farmacji Agnieszki Zajdy do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, uwzględniając wysoki poziom pracy, jej aplikacyjność, oraz znaczącą wartość otrzymanych wyników, które zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, pragnę złożyć wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Agnieszki Zajdy pt. „Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej”.

dr hab. n. farm. Jakub Rok

ADIUNKT BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Jakub Rok
dr hab. n. farm. Jakub Rok