

Warszawa, 27.07.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Agnieszki Zajdy

pt. „Analiza aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej”

wykonanej pod kierunkiem Promotora dr hab. n. farm. Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, prof. uczelni w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy leku i Radiofarmacji Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Podstawę opracowania recenzji stanowiło pismo Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – prof. dr hab. n. med. Anny Kilianowicz-Sapoty z dnia 03.07.2023 r. oraz przekazana rozprawa doktorska.

Praca doktorska mgr Agnieszki Zajdy została przygotowana w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji wchodzącym w skład Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Tematyka pracy dotyczyła analizy aktywności biologicznej nowych analogów metforminy o budowie sulfonamidowej i była zbieżna z cyklem 3 publikacji składających się na niniejszą dysertację. Metformina będąca dimetylową pochodną biguanidu jako doustny lek hipoglikemizujący została zastosowana po raz pierwszy w leczeniu cukrzycy typu 2 w końcu lat 50-tych XX wieku. Obecnie jest lekiem pierwszego wyboru, który w postaci doustnej jest podawany codziennie 150 mln pacjentów na całym świecie. W cukrzycy typu 1 metformina podawana w leczeniu skojarzonym może okazać się pomocna w obniżeniu dawki insuliny. Jej działanie plejotropowe pozwala na wykorzystanie jej właściwości w leczeniu innych jednostek chorobowych w procesie repozycjonowania. Korzystny wpływ na profil lipidowy osocza, nasilenie aktywności fibrynolitycznej osocza, redukcja stresu oksydacyjnego i ochronny wpływ na układ sercowo-naczyniowy pozwala mieć nadzieję, na jej wykorzystanie nie tylko jako środka hipoglikemizującego, ale również jako leku opóźniającego starzenie stosowanego w chorobach neurodegeneracyjnych i przedłużającego życie, kardioprotekcyjnego i przeciwwzkrzepowego, przeciwbakteryjnego i przeciwwirusowego oraz przeciwnowotworowego.

Nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań przesiewowych 14 nowych, nieopisanych dotychczas w literaturze pochodnych metforminy o budowie sulfonamidowej, które zostały zsyntetyzowane w University of Eastern Finland w ramach współpracy jednostki z fińskim ośrodkiem akademickim. Motywem przewodnim poszukiwań nowych farmakologicznych kierunków działania pochodnych metforminy jest efekt Paracelsusa, który zwrócił uwagę, że decydującą rolę w zwalczaniu chorób odgrywają zawarte w roślinach substancje czynne. Zgodnie z Jego stwierdzeniem, choroba jest zawsze wynikiem zaburzeń procesów chemicznych przebiegających w organizmie, więc leczenie powinno polegać na podawaniu związków chemicznych, przywracających tę równowagę. W ramach celu nadrzędnego przeprowadzone badania wykonano w czterech etapach rozpoczynając od szczegółowej analizy potencjału terapeutycznego jako środka opóźniającego starzenie z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów działania metforminy jako leku o wielokierunkowym działaniu, poprzez ocenę aktywności biologicznej nowych sulfonamidowych analogów metforminy i badanie ich biozgodności w modelu ludzkich erytrocytów po ustaleniu zależności pomiędzy budową a aktywnością biologiczną badanych pochodnych.

Recenzowaną pracę doktorską przygotowano w formie autoreferatu wraz z załącznikami. W początkowej części pracy autorka przedstawiła swój dorobek oraz wykaz stosowanych skrótów. Kolejno w autoreferacie umieszczono obszerne wprowadzenie, podano cele naukowe prowadzonych badań, część eksperymentalną obejmującą metody badawcze, wyniki przeprowadzonych badań, dyskusję i podsumowanie wyników oraz końcowe wnioski. Całość autoreferatu została zakończona spisem piśmiennictwa obejmującym 150 pozycji, ściśle związanych z tematyką badawczą rozprawy, w większości z ostatniej dekady. Do autoreferatu dołączono publikacje z zawartymi w nich wynikami oraz oświadczenia współautorów.

Podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Zajdy stanowi cykl trzech ściśle powiązanych tematycznie prac opublikowanych w latach 2020-2023 o sumarycznym współczynniku oddziaływania (IF) wynoszącym 16,808 i łącznej punktacji MEiN 340. We wszystkich pracach Pani mgr Zajda jest pierwszym autorem, a Jej udział procentowy w przygotowaniu kolejnych prac wyniósł 55-70% i dotyczył przeglądu dostępnej literatury



naukowej, współtworzeniu koncepcji i planu pracy. Dominujący wkład mgr Zajdy podczas wykonywania części eksperymentalnej i zredagowania manuskryptów nie budzi wątpliwości.

We wprowadzeniu do autoreferatu Doktorantka przedstawiła ważne informacje dotyczące patogenezы cukrzycy typu 2 kładąc szczególny nacisk na towarzyszące cukrzycy zaburzenia układu krzepnięcia i fibrynolizy, Dodatkowo omówiła zasady postępowania przeciwzakrzepowego jak również zasady leczenia samej cukrzycy przy zastosowaniu współczesnych środków hipoglikemizujących. Przedstawiając charakterystykę fizykochemiczną i farmakokinetyczną metforminy uwzględniła aspekty farmakogenetyczne i farmakodynamiczne jakże ważne podczas prowadzenia tejże terapii. Dokonała również przeglądu literatury pod kątem modyfikacji strukturalnej szkieletu metforminy i omówiła zagadnienia związane z repozycjonowaniem leków i politerapią. Obszerny wstęp pozwolił na przejrzyste i precyzyjne określenie celów pracy.

Pierwsza publikacja jest pracą przeglądową stanowiącą aktualizację wiedzy i kompendium osiągnięć dotyczących wpływu metforminy na rozwój i progresję chorób związanych ze starzeniem się organizmu, które obejmowały zarówno badania przedkliniczne z wykorzystaniem linii komórkowych oraz modeli zwierzęcych, jak również badania kliniczne. Publikacja stanowi silne uzasadnienie prowadzonych badań dotyczących korzystnego wpływu metforminy na czynność układu sercowo-naczyniowego, jak również jej właściwości antykoagulacyjnych i hipoglikemizujących z oceną cytotoksyczności nowych sulfonamidowych analogów biguanidu.

Druga publikacja ocenia wpływ nowych pochodnych metforminy na żywotność, integralność oraz morfologię ludzkich komórek śródbłonna żyły pępowinowej oraz ludzkich komórek mięśni gładkich aorty z wykorzystaniem eksperymentalnych modeli układu naczyniowego *in vitro*. Przeprowadzono również test utylizacji glukozy i ocenę wpływu nowych pochodnych metforminy na migrację komórek HUVEC i uwalnianie tkankowego aktywatora plazminogenu z tychże komórek. Ponadto dokonano oceny wpływu nowych pochodnych metforminy na proces polimeryzacji, na aktywność antytrombiny III i czynnika X i proces krzepnięcia po generacji endogennej trombiny.

Trzecia publikacja to przede wszystkim cztery dominujące zagadnienia: badanie oddziaływania nowych pochodnych metforminy na potencjał błony mitochondrialnej, gdyż akumulacja w



mitochondriach jest submolekularnym celem działania metforminy; ich wpływ na aktywność trombiny, na hemolizę i morfologię krwinek czerwonych.

W podsumowaniu wyników badań naukowych obejmujących analizę zależności pomiędzy budową chemiczną nowych sulfonamidowych analogów metforminy a ich aktywnością biologiczną Doktorantka szczególną uwagę zwróciła na rezultaty badań dotyczące perspektywicznego bezpieczeństwa terapii uwzględniając ich właściwości antykoagulacyjne i cytotoksyczne w modelach hodowli komórek *in vitro*, a mianowicie:

- alkilowe pochodne metforminy (1-3) wykazały najkorzystniejszy profil bezpieczeństwa w stężeniach do 1,5 $\mu\text{mol/ml}$

- modyfikacja szkieletu metforminy w sulfonamid z n-butylovym podstawnikiem prowadziła do uzyskania związku o najmniejszej cytotoksyczności

- podstawienie pierścienia aromatycznego ugrupowaniem cyjanowym w pozycji *orto*, *meta* i *para* skutkowało wzrostem cytotoksyczności benzenosulfonamidowych pochodnych metforminy, co przejawiało się zmniejszeniem żywotności komórek i spadkiem integralności komórek śródbłona,

-zarówno wszystkie pochodne alkilowe jak również *meta* i *para* podstawione benzenosulfonamidy, podobnie jak sama metformina zwiększały wychwyt glukozy w komórkach HUVEC, co może wskazywać na ich potencjalne działanie hipoglikemizujące,

- przekształcenie cząsteczki metforminy w sulfonamidy zawierające układ aromatyczny (związki 5, 9-14) skutkowało hamującym działaniem wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia i procesu polimeryzacji fibryny. Natomiast wprowadzenie grupy metoksylowej, nitrowej lub aminowej do pierścienia aromatycznego benzenosulfonamidowych analogów metforminy w pozycji *meta* determinowało wpływ na zewnątrzpochodny szlak krzepnięcia,

- zastosowanie wieloparametrycznego modelu (CL-test) dowodziło, iż przyłączenie grupy nitrowej do pierścienia benzenu w pozycji *meta* prowadzi do uzyskania związku o potencjalnej aktywności antykoagulacyjnej,

- przeprowadzenie modyfikacji chemicznej struktury metforminy z przyłączonym podstawnikiem aminowym umożliwiło uzyskanie związku o najsilniejszym efekcie hamującym maksymalną aktywność trombiny w całym badanym zakresie stężeń,



- nowe benzenosulfonamidowe pochodne oparte na szkielecie metforminy podstawione grupą aminową w pierścieniu aromatycznym indukowały znaczny spadek mitochondrialnego potencjału membranowego co w perspektywie może zostać wykorzystane w leczeniu wtórnych defektów związanych z cukrzycą,

- nowo zsyntetyzowane analogi metforminy poza cyjanobenzenosulfonamidami były hemokompatybilne nie wykazując niekorzystnego wpływu na integralność błony erytrocytarnej.

W trakcie czytania pracy zwróciłem uwagę na niektóre drobne błędy edytorskie, bądź fragmenty tekstu, które wymagają wyjaśnienia. Jednocześnie pragnę stwierdzić, że w niczym nie umniejszają one wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy.

Pierwsza uwaga dotyczy znaku interpunkcyjnego: przecinka zamiast kropki, który powinien się znaleźć w zapisie liczbowym zawierającym części dziesiętne w autoreferacie podczas podawania wyników badań. Kropka jest stawiana w tekście anglojęzycznym (w publikacjach), przecinek w opisie tekstowym.

Na stronie 41 dodanie słowa ma, „oraz ma wpływ na metabolizm kwasów żółciowych i mikrobiom”, czyni zdanie bardziej czytelnym.

- Na stronie 55 i 56 legenda pod ryciną 14 powinna dotyczyć etapów zapisanych arabskimi cyframi jak na schemacie i w tekście a nie rzymskimi (ujednolicenie zapisu).

Na stronie 75 zostało napisane, że „związki poddano dalszym pogłębionym badaniom oceniającym ich wpływ na ogólny potencjał tworzenia skrzepu i fibrynolizy przy użyciu wieloparametrycznego modelu z własnym programem komputerowym”. Prosiłbym Doktorantkę o informację o jaki program chodzi i podanie krótkiego wyjaśnienia z zastosowaniem jakich kryteriów i parametrów został on stworzony przy wykorzystaniu określonego języka komputerowego.

Ostatni mój komentarz ma raczej charakter inicjujący dyskusję. Nie tak dawno została opublikowana praca przeglądowa autorstwa kanadyjsko-katarskiej grupy autorów pt. „Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases?” w czasopiśmie *Metabolism* (Elsevier),

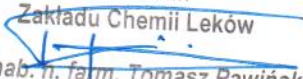
- ([https:// doi.org/1016/j.metabol.2022.155223](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155223)). Wnioski z pracy są w pewien sposób zbieżne z przedstawionymi przez Doktorantkę w dysertacji, nie mniej chciałbym poznać zdanie Pani mgr



Zajdy odnośnie ryzyka-korzyści podczas długotrwałego stosowania metforminy (przez wiele lat). Czy jest to do końca bezpieczna terapia, nie pozbawiona jakichkolwiek zagrożeń.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że mgr Agnieszka Zajda wywiązała się w pełni z założonych celów badawczych otrzymując niezwykle cenne wyniki w trakcie przeprowadzonych eksperymentów, co znalazło swoje odzwierciedlenie w publikacjach o wysokim współczynniku oddziaływania. Całość pracy doktorskiej potwierdza znakomitą orientację Doktorantki w problematyce będącej przedmiotem badań. Potwierdzenie we wnioskach końcowych przez autorkę rozprawy konieczności kontynuowania badań *in vivo* w celu uzyskania pełnego modelu skuteczności i bezpieczeństwa nowo zsyntetyzowanych sulfonamidowych analogów metforminy świadczy o posiadanych przez Nią dalszych planach naukowych, które potwierdziłyby dotychczasowe rezultaty pracy badawczej.

Uważam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Zajdy 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. 2018, poz. 1669). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Chemii Leków

Dr hab. n. farm. Tomasz Pawiński