UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
prof. dr hab. n. farm. Dorota Gabriela Piotrowska

Łódź 11 sierpnia 2021

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anety Kaczor zatytułowanej

***„New 2-aminoimidazolone derivatives as adjuvants able to inhibit mechanisms of bacterial and cancer multidrug resistance"* przedstawiona Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Technologii i Biotechnologii Środków Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Jadwigi Handzlik, w zespole, który od wielu lat zajmuje się syntezą i oceną właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych wybranych pochodnych związków heterocyklicznych, z uwzględnieniem molekularnych mechanizmów aktywności farmakologicznej. Zadaniem badawczym jakie postawiła sobie mgr Aneta Kaczor była synteza nowych połączeń w grupie pochodnych hydantoiny i ocena ich aktywności biologicznej. Jest to tematyka wysoce aktualna i nowatorska. Należy podkreślić, że poszukiwanie nowych skutecznych adjuwantów stanowi obiecujące podejście w zwalczaniu infekcji drobnoustrojowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa przygotowana została w języku angielskim w formie 100-stronnicowego autoreferatu stanowiącego komentarz do spójnego tematycznie cyklu czterech współautorskich wysoko punktowanych prac o zasięgu międzynarodowym, które opublikowane zostały w latach 2019–2021. Dokumentację uzupełniają kopie wszystkich prac uwzględnionych we wspomnianym cyklu oraz oświadczenia współautorów. Do przedstawienia dysertacji w takiej formie upoważnia Doktorantkę nie tylko sam fakt wcześniejszego opublikowania wyników badań, ale przed wszystkim niezaprzeczalny znaczący Jej udział w powstaniu publikacji. We wszystkich czterech pracach, stanowiących podstawę dysertacji mgr Kaczor jest pierwszym autorem, a z dołączonych oświadczeń jednoznacznie wynika, że Doktorantka wniosła istotny wkład w powstanie koncepcji przedstawionych badań, zsyntezowała opisane w pracy nowe

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mali: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

związki chemiczne, potwierdziła ich czystość i udowodniła budowę, a także uczestniczyła w badaniach aktywności biologicznej otrzymanych związków. Oceniając wyniki badań uzyskanych przez mgr Anetę Kaczor należy podkreślić, że wszystkie cztery prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR i merytorycznie ocenione przez niezależnych recenzentów. Zadanie recenzenta rozprawy sprowadza się zatem do oceny zakresu przedstawionych prac badawczych w kontekście podjętej tematyki. W swojej recenzji skoncentruję się przede wszystkim na merytorycznej ocenie autoreferatu, będącego autorskim opracowaniem przygotowanym przez Doktorantkę.

Opis prac własnych poprzedzony został obszernym wprowadzeniem, w którym Doktorantka przedstawiła problem lekooporności w leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz chorób nowotworowych zwracając uwagę na złożone mechanizmy molekularne. Zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania związków chemicznych zdolnych do blokowania co najmniej jednego mechanizmu oporności na leki, tzw. adjuwantów. W swoich pracach badawczych mgr Kaczor skoncentrowała się na poszukiwaniu nowych, skutecznych adjuwantów w grupie sfunkcjonalizowanych pochodnych 2-aminoimidazolonu. W świetle podjętych badań na szczególną uwagę zasługuje podrozdział opisujący wcześniejsze badania nad pochodnymi hydantoiny i imidazolonu. W oparciu o wyniki analizy zależności struktura – aktywność przeprowadzonej dla związków otrzymanych wcześniej w macierzystym zespole oraz z wykorzystaniem filtrów ADMET dostępnych w portalach bioinformatycznych Doktorantka wytypowała struktury wiodące i przeprowadziła racjonalne projektowanie serii nowych pochodnych, co bardzo dobrze świadczy o merytorycznym przygotowaniu mgr Kaczor, która udowodniła, że potrafi krytycznie analizować pozyskane dane i wyciągać logiczne wnioski.

Cel i zakres prac zdefiniowany został w sposób przejrzysty w rozdziale *„3. The aim of the study"*, a wyniki prac eksperymentalnych opisano w kolejnych podrozdziałach czyniąc autoreferat doskonałym przewodnikiem do cyklu publikacji (publikacje **A** – **D**), który dodatkowo uzupełnia podrozdział opisujący nieopublikowane dotąd wyniki. Mgr Aneta Kaczor uczestniczyła w wielokierunkowym projekcie realizowanym w zespole prof. Handzlik w ramach interdyscyplinarnej współpracy krajowej i zagranicznej. Dlatego na uznanie zasługuje szczegółowy opis metodologii i stosowanych technik badawczych przedstawiony w rozdziale *„4. Methodology"*, w którym Doktorantka wyraźnie rozgranicza badania wykonane przez nią samodzielnie od tych wykonanych przez współpracowników (w tym badania krystalograficzne, część badań oceny aktywności biologicznej, badania *in silico*). Jednocześnie należy podkreślić niebudzący wątpliwości udział mgr Anety Kaczor w interpretacji wyników uzyskanych na poszczególnych etapach prac.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mali: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Prace badawcze mgr Kaczor rozpoczęła od zaprojektowania i syntezy jedenastu nowych związków, serii 5-arylidenoimidazolonów, które otrzymane zostały w sekwencji reakcji kondensacji Knoevenagla hydantoiny z aromatycznymi aldehydami w środowisku zasadowym, S-metylowania otrzymanych 5-arylidenoimidazolonów jodkiem metylu, a następnie reakcji z 3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)propyloaminą albo 3-morfolinopropyloaminą. Doktorantka udowodniła, że podstawieniu grupy S-metylowej przy C2 w imidazolonie pierwszorzędową aminą towarzyszy następcze przegrupowanie Dimrotha z utworzeniem pochodnych 2-amino-5-arylidenoimidazolonów podstawionych przy N3 fragmentem 4-metylopiperazynopropylowym albo morfolinopropylowym (publikacja **A**). Doktorantka zamierzała zbadać wpływ podstawnika aromatycznego na obserwowaną aktywność biologiczną. W dalszym rozwinięciu projektu, w oparciu o uzyskane na tym etapie wyniki badań biologicznych, Doktoranta poszerzyła serię związków o kolejne pochodne 2-amino-5-arylideno-3-(morfolinoalkilo)imidazolonowe, a także pochodne z podstawioną grupą aminową w pozycji C2 pierścienia imidazolonowego (publikacje **B**–**D**). Z punktu widzenia analizy zależności struktura – aktywność biologiczna na uznanie zasługuje również zamysł uzupełnienia serii badanych związków o pochodne tiazolonowe, w przypadku których przegrupowanie Dimrotha jest wykluczona, a tym samym możliwa jest odpowiednia funkcjonalizacja grupy aminowej w pozycji C2 (publikacja **C**). Szkoda, że otrzymano tylko dwie pochodne tiazolonowe, obie z ugrupowaniem (9*H*-fluoren-2-ylo)metylenowym w pozycji C5. Analizując dane zestawione w tabeli 5.3 (oraz publikacja **C**) nasuwa się pytanie, czym Doktorantka kierowała się przy wyborze podstawnika aromatycznego projektując pochodne tiazolonowe? Biorąc pod uwagę obiecującą aktywność adjuwantową pochodnych imidazolonowych z innymi podstawnikami aromatycznymi interesujące wydaje się otrzymanie również i ich tiazolonowych analogów. Zachęcam Doktorantkę do kontynuowania tego wątku badań.

Poprawność przeprowadzonych analiz strukturalnych nieopisanych wcześniej 150 nowych związków organicznych nie budzi zastrzeżeń, a mgr Kaczor wykazała się biegłością w interpretacji widm NMR. Szkoda, że w opisie zastosowanych procedur syntetycznych nie podkreślono stereospecyficznego przebiegu reakcji kondensacji tiohydantoiny albo 4-tiooksotiazolidyn-4-onu z odpowiednimi aromatycznymi aldehydami.

Niezwykle istotne z punktu widzenia chemii medycznej jest znaczne zróżnicowanie strukturalne w serii otrzymanych pochodnych. Zaproponowano kilkuetapową ścieżkę syntezy z użyciem łatwo dostępnych substratów, obejmującą proste i wydajne przekształcenia, która umożliwia zmianę topologii podstawienia w szkielecie imidazolonu. Łącznie mgr Kaczor otrzymała 49 związków finalnych, z których aż 15 wykazało działanie jako adjuwanty antybiotyków β-

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mali: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

laktamowych w szczepach MRSA. Za również ważne osiągniecie należy uznać wskazanie kilkunastu związków wykazujących silne działanie hamujące wyrzut substratu poprzez trójdzielną pompę AcrAB-TolC w szczepach *Klebsiella aerogenes*. Kilkanaście pochodnych spośród wszystkich otrzymanych związków wykazywało również działanie modulatora pompy nowotworowej ABCB1 w modelu chłoniaka (T-lymphoma). Co więcej aktywność inhibicyjna dwóch związków okazała się porównywalna z tariquidarem, użytym jako związek referencyjny. Biorąc pod uwagę problem selektywności w terapii przeciwnowotworowej na wysoką ocenę zasługuje fakt, że dwa sfunkcjonalizowane 5-arylidenimidazolony otrzymane przez Doktorantkę wykazywały aktywność wyższą niż lek referencyjny – doksorubicyna, przy jednoczesnym indeksie selektywności ponad 40.

Na uznanie zasługuje to, że w swoich pracach mgr Kaczor nie poprzestała na wskazaniu najaktywniejszych związków i podjęła próbę identyfikacji potencjalnych mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zdolność badanych związków do hamowania białek lekoopornych. W oparciu o wyniki dokowania i dynamiki molekularnej Doktorantka postuluje, że prawdopodobny mechanizm odpowiedzialny za podnoszenie skuteczności antybiotyków β-laktamowych przez aktywne 5-arylidenoimidazolony polega na modulacji allosterycznej białka PBP2a. Ponadto na podstawie testów *in vitro* oraz modelowania molekularnego mgr Kaczor ustaliła, że hamowanie wyrzutu fluorescencyjnego substratu pompy nowotworowej ABCB1 wynika najprawdopodobniej z konkurencyjnego wypierania substratu w miejscu wiążącym.

W podsumowaniu części badań własnych pragnę podkreślić, że zostały one zaplanowane logicznie, a konsekwencja i następczość podejmowanych zadań świadczy o metodycznym podejściu do badanego zagadnienia. Mgr Kaczor opanowała warsztat syntetyczny, biegle posługuje się nowoczesnymi metodami identyfikacji związków organicznych. Potrafi planować prace eksperymentalne, analizować uzyskane wyniki i wyciągać racjonalne wnioski. Potwierdza to nie tylko doskonałe przygotowanie warsztatowe, ale również dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki.

Mgr Aneta Kaczor jest młodym naukowcem, o wyróżniającym dorobku naukowym, na który składa się 8 współautorskich prac oryginalnych (w tym 4 poza cyklem przedstawionym jako rozprawa doktorska) opublikowanych w latach 2016–2021 o sumarycznym IF = 27,216 (pkt. MNiSzW = 689). Podkreślić należy wybiegającą poza standardową aktywność Doktorantki już na bardzo wczesnym etapie działalności naukowej. Mgr Kaczor jest laureatem stypendium przyznawanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (projekt „Diamentowy

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mali: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Grant"), dzięki któremu jeszcze przed uzyskaniem stopnia magistra farmacji miała szansę rozpocząć studia doktoranckie. Prace badawcze mgr Kaczor realizowała w ramach interdyscyplinarnej współpracy m.in. z Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej oraz Katedry Chemii Analitycznej macierzystego uniwersytetu, jak również współpracy międzynarodowej z zespołami naukowym z Uniwersytetu w Szeged (Węgry), Uniwersytetem Aix-Marseille we Francji, Uniwersytetami w Saarlandzie i Jenie w Niemczech.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca mgr Anety Kaczor spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r; Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami Dz.U. z 2016. Poz. 882*). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom przeprowadzonych badań, aktualność tematyki badawczej i walory aplikacyjne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bioorganicznej
prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 33
e-mali: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl