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

Łódź 15 listopada 2023

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Dągmary Ziembickiej zatytułowanej

„Synteza, struktura i aktywność przeciwprątkowa nowych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny” przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w ramach współpracy pomiędzy Gdańskiem Uniwersytetem Medycznym a Politechniką Łódzką pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Gobis oraz dr hab. Małgorzaty Szczesio, profesora uczelni.

Mimo że gruźlica jest jedną z najstarszych chorób zakaźnych, której czynnik etiologiczny został zidentyfikowany, to jej skuteczna terapia w dalszym ciągu stanowi wyzwanie współczesnej medycyny. W skuteczności podjętej przez WHO strategii zmierzającej do eradykacji gruźlicy, niezależnie od działań profilaktycznych mających na celu ograniczenie transmisji szczepów lekoopornych, ogromne znaczenie ma rozwój nowych szczepionek oraz leków przeciwgruźliczych. Pani mgr inż. Dągmara Ziembicka podjęła się ambitnego zadania polegającego na poszukiwaniu nowych kandydatów na leki przeciwprątkowe w grupie dwupodstawionych amidrazonowych pochodnych wybranych związków heterocyklicznych. Wobec obserwowanego w ostatnich latach wzrostu zachorowalności na gruźlicę recenzowana rozprawa jest zatem wysoce aktualna.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ powszechnie przyjęty dla prac doktorskich i zawiera jedenaście głównych rozdziałów: *Wprowadzenie, Część teoretyczną, Cel pracy, Badania własne, Omówienia wyników badań biologicznych, Analizę struktura-aktywność, Część doświadczalną, Wnioski, Streszczenie, Wykaz skrótów* oraz *Piśmiennictwo*. Taki układ jest oczywiście poprawny, choć zdaniem recenzenta rozdziały *Omówienie wyników badań biologicznych* oraz *Analiza struktura-aktywność* powinny zostać uwzględnione jako odpowiednie podrozdziały w części *Badania własne*, bowiem nawet jeżeli badania te zostały wykonane w ramach podjętej wieloosrodkowej współpracy, to nie ma wątpliwości, że Doktorantka podjęła się zadania interpretacji uzyskanych wyników i wyciągnęła logiczne wnioski, które następnie przedstawiła w postaci analizy SAR.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

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

Dysertację rozpoczyna krótkie *Wprowadzenie* w problematykę badawczą, a następnie w *Części teoretycznej* szczegółowo przedyskutowano stan wiedzy na temat aktualnie stosowanych leków przeciwgruźliczych oraz ich mechanizmów oporności, przedstawiono kliniczne perspektywy leków przeciwgruźliczych z uwzględnieniem leków hybrydowych, a także użyteczności badań krystalograficznych w projektowaniu leków. Rozdział ten, przygotowany w oparciu o rzetelny przegląd literatury, stanowi doskonale wprowadzenie w podjęty wątek badawczy i jednocześnie dowodzi, że Doktorantka potrafi krytycznie analizować wyniki wcześniejszych prac. Zachęcam Doktorantkę, do przygotowania pracy przeglądowej w oparciu zgromadzony do tego rozdziału materiał i jego ewentualne uaktualnienie. Do tej części pracy mam jedynie drobną uwagę formalną dotyczącą nomenklatury. Na stronie 25 (Rys. 12) Autorka opisuje hybrydową pochodną pirazynamidu i kwasu *p*-aminosalicylowego o udokumentowanej aktywności przeciwprądkowej oraz jej odpowiedni prolek, który błędnie nazwano δ -laktonem. δ -Lakton powstaje w wyniku wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji kwasu δ -hydroksykarboksylowego, a nie z takim połączeniem mamy do czynienia w przypadku wspomnianego proleku.

Poszczególne cele badawcze zostały jednoznacznie zdefiniowane. Zadaniem badawczym jakiego podjęła się mgr inż. Dagmara Ziembicka było zaprojektowanie i synteza nowych amidrazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny (serie związków przedstawione ogólnymi wzorami **E – J**), przy czym zaproponowane modyfikację uwzględniały m.in. zmiany podstawników w pierścieniach heteroaromatycznych oraz zamianę funkcji tiokarbonylowej we fragmencie tiosemikarbazonowym na ugrupowanie metylenowe. Zaplanowano wyznaczenie struktury krystalicznej dla wybranych pochodnych z zamiarem przeprowadzenia analizy konformacyjnej, analizy oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych oraz typu upakowania w cząsteczce. Najważniejszym aspektem badawczym interdyscyplinarnego projektu była ocena aktywności tuberkulostatycznej otrzymanych związków oraz przeprowadzenie analizy struktura-aktywność w grupie badanych połączeń. Na wysoką ocenę zasługuje zamysł wykonania dla najaktywniejszych związków poszerzonych badań mikrobiologicznych oraz oceny cytotoksyczności. To wyjątkowo dobrze świadczy o wiedzy Doktorantki, która doskonale rozumie potrzebę określenia selektywności działania, tak ważnego z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania otrzymanych związków.

Prace badawcze rozpoczęto od syntezy zaprojektowanych związków. Na wysoką ocenę zasługuje logiczne i racjonalne podejście do modyfikacji struktur obejmującej wybór odpowiednich podstawników w pierścieniu pirydyny i pirazyny, a także w ugrupowaniu tiosemikarbazonowym. Wyselekcjonowano podstawniki kierując się ich wielkością, lipofilowością, jak również właściwościami kwasowo-zasadowymi. Synteza zaprojektowanych związków zawierających tiosemikarbazonowy fragment strukturalny wymagała opracowania dogodnych ścieżek syntetycznych umożliwiających jednocześnie dodatkową funkcjonalizację pierścieni heteroaromatycznych odpowiednimi podstawnikami. Z tego zadania Doktorantka wywiązała się znakomicie udowadniając jednocześnie doskonale przygotowanie warsztatowe. Prace rozpoczęto od

tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny zawierających w pozycji C6 atom chloru (związki **3** – **10**). W dalszym rozwinięciu serię zaprojektowanych związków poszerzono o pochodne zawierające w pozycji C6 podstawnik aminowy albo fenoksyłowy (pochodne pirazyny **19** – **34** oraz pirydyny **35** – **50**), a także odpowiednie analogi pirydyny sfunkcjonalizowane ugrupowaniami aminowymi w pozycji C4 (związki **52** – **60**). Z punktu widzenia przeprowadzenia pogłębionej analizy struktura-aktywność ważnym rozszerzeniem biblioteki zaprojektowanych związków są analogiczne serie pochodnych, w których w miejscu funkcji tiokarbonylowej w pochodnych tiosemikarbazonowych wprowadzono ugrupowanie metylenowe (2,6-dwupodstawione pochodne pirazyny **73** – **92**, 2,6-dwupodstawione pochodne pirydyny **93** – **112**, oraz 2,4-dwupodstawione pochodne pirydyny **113** – **120**). Doktorantka zaproponowała dogodną metodę syntezy wykorzystującą jako kluczowy etap reakcję kondensacji odpowiednich amidrazonów z aldehydami. Opis prac związanych z syntezą, wyodrębnianiem i identyfikacją wszystkich zaprojektowanych nowych związków zasługuje na wysoką ocenę. Należy podkreślić imponującą liczbę nowych związków otrzymanych przez Doktorantkę (120 pochodnych pirazyny i pirydyny). Przedstawione dowody strukturalne nie budzą wątpliwości. Mgr inż. Dagmara Ziembicka nie tylko posiada umiejętności w zakresie syntezy organicznej, swobodnie posługuje się również nowoczesnymi metodami identyfikacji związków organicznych o złożonej strukturze. Struktury i czystości otrzymanych pochodnych potwierdzone zostały wynikami analizy spektralnej (widma ^1H NMR i IR) oraz analizami elementarnymi. Dla większości związków wykonano również widma ^{13}C NMR oraz rentgenowską analizę strukturalną. Załączone w pracy wydruki widm dla wybranych pochodnych wraz z ich interpretacją potwierdzają czystość chemiczną otrzymanych pochodnych, co bardzo dobrze świadczy o technice pracy Doktorantki, doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego i rzetelności naukowej.

Na wysoką ocenę zasługują podjęte przez mgr inż. Dagmarę Ziembicką studia zmierzające do zbadania równowag tautomercznych w grupie pochodnych tiosemikarbazonowych. Doktorantka przeprowadziła w tym celu pogłębioną analizę widm ^1H NMR (pomiarzy zmiennotemperaturowe), podjęto również próby wyznaczenia względnej trwałości tautomerów w oparciu o obliczenia kwantowo-mechaniczne. Największym osiągnięciem tej części badań jest wykazanie, że 2-[amino(6-chloropirazyn-2-yl)metyleno]-*N,N*-dimetylohydrazynokarbonioamid (**6**) zarówno w ciele stałym jak i w roztworze występuje w postaci odpowiedniej formy tautomercznej z labilnym atomem wodoru przy atomie azotu N3 (forma tautomerczna B przedstawiona na rys. 25, str. 41), podczas gdy 6-chloro-*N*'-(morfolino-4-karbonioilo)pirazyno-2-karbohydrazonamid (**3**) w ciele stałym występuje w formie tautomercznej z labilnym atomem wodoru przy atomie azotu N2 (forma tautomerczna A przedstawiona na rys. 25, str. 41), zaś w roztworze chloroformowym tworzy mieszaninę obu tautomerów. Doktorantka słusznie zwraca uwagę na to jak ważne jest poznanie równowag tautomercznych w kontekście świadomego projektowania cząsteczek związków biologicznie czynnych. W tym miejscu mam jednak drobną uwagę

dotyczącą pewnych „skrótów myślowych” stosowanych w opisie prezentowanych zagadnień. Doktorantka rozważa „stabilizację równowag tautomerycznych”, podczas gdy właściwym jest analizowanie położenia równowagi w badanej tautomerii pochodnych tiosemikarbazonowych, która zależna jest od termodynamicznej trwałości obu form, na którą wpływa wielu czynników, w tym również rozpuszczalnik i temperatura. Biorąc pod uwagę powyższe prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- proszę o doprecyzowanie, na czym polegał problem z jednoznacznym określeniem dominującej formy tautomerycznej dla związków **3** i **6** w roztworach wykonanych w deuterowanym dimetylosulfotlenku (DMSO- d_6)?
- W kontekście planowanych badań biologicznych i prób powiązania aktywności z trwałością odpowiednich form tautomerycznych, proszę o komentarz dotyczący wyboru rozpuszczalnika ($CDCl_3$), w którym wykonano widma 1H NMR (pomiaru zmiennotemperaturowe).

Kolejnym zadaniem badawczym jakiego podjęła się mgr inż. Dagmara Ziembicka była ocena zdolności tuberkulostatycznej, przeciwdrobnoustrojowej oraz cytotoksyczności otrzymanych związków wykonane we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz firmą Sunny BioDiscovery w Santa Paula, CA, USA. Badania aktywności przeciwpłatkowej przeprowadzono na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*; standardowym H₃₇Rv oraz klinicznym Spec. 210, wykazującym oporność na powszechnie stosowane tuberkulostatyki (izoniazyd, rifampicyna, etambutol, kwas *p*-aminosalicylowy). Jako związek referencyjny zastosowano izoniazyd. Poprawność przyjętych założeń projektu potwierdzona została uzyskanymi wynikami aktywności przeciwpłatkowej w badanych grupach pochodnych. Ważnym osiągnięciem tej części projektu było wyłonienie najbardziej aktywnych 2,6-dwupodstawionych pochodnych pirydyny w grupie połączeń tiosemikarbazonowych, w której 16 z 20 badanych związków wykazywało aktywność inhibicyjną 2- do 16-krotnie wyższą wobec szczepu lekoopornego w porównaniu z izoniazylem.

Logicznym uzupełnieniem tej części badań było wyselekcjonowanie najaktywniejszych pochodnych (MIC < 4 μ g/ml wobec co najmniej jednego szczepu *Mycobacterium tuberculosis*) i ocena ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec 6 szczepów bakterii Gram-dodatnich, 5 szczepów bakterii Gram-ujemnych oraz 3 szczepów grzybów. Wśród wspomnianych 2,6-dwupodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny wyłoniono dwa związki (**41** i **45**), wykazujące zdolność do selektywnego hamowania wzrostu szczepów *Mycobacterium tuberculosis*, podczas gdy wobec pozostałych badanych szczepów mikroorganizmów (MIC > 1000 μ g/ml) pozostawały one nieaktywne. Jednocześnie wykazano brak działania cytotoksycznego wobec komórek HeCaT (nienowotworogenna, unieśmiertelniona linia

komórek ludzkich keratocytów). Wysoko ocenić należy przeprowadzoną przez Doktorantkę pogłębioną analizę struktura-aktywność w grupie badanych pochodnych tiosemikarbazonowych oraz odpowiednich analogów z grupą metylenową (C=S vs. =CH-), którą Autorka w sposób przejrzysty podsumowała na rysunkach 84 (str. 131) oraz 86 (str. 126) wskazując elementy strukturalne odpowiedzialne za wzrostu aktywności przeciwpłatkowej bądź jej obniżenie.

W podsumowując prac badawczych przedstawionych w rozprawie doktorskiej mgr inż. Dagmary Ziembickiej należy podkreślić, że zostały one zaplanowane racjonalnie, a poszczególne cele konsekwentnie realizowane. Doktorantka udowodniła, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe, umie pracować zespołowo podejmując się interpretacji wyników na kolejnych etapach realizacji projektu. Oprócz pozytywnej oceny merytorycznej dysertacji, którą charakteryzuje wysoki stopień trudności związany z interdyscyplinarnym charakterem badań, na podkreślenie zasługuje również to, że napisana ona została poprawnym językiem, choć Doktorantce nie udało się uniknąć nieprecyzyjnych sformułowań:

- str. 38: „...zaprojektowano kolejne trzy serie związków pozwalające na sprawdzenie istotności ugrupowania tiosemikarbazonowego poprzez jego wymianę na ugrupowanie iminowe”; powyższe zdanie sugeruje, że ugrupowanie tiosemikarbazonowe zastąpione zostało iminowym, zaś w rzeczywistość we fragmencie tiosemikarbazonowym funkcję tiokarbonylową zastąpiono metylenową (C=S vs. =CH-);
- Doktorantka kilkakrotnie wspomina o planowaniu/projektowaniu serii syntez; w kontekście prowadzonych badań lepiej mówić o projektowaniu serii związków, a opracowana metoda ich synteza jest jedynie „narzędziem” umożliwiającym ich otrzymanie;
- str. 44: „czynniki nukleofilowe”; lepiej odczynniki nukleofilowe.
- str. 111: „Jako lek referencyjny zastosowano izoniazyd, którego wartość MIC kształtowała się na poziomie 0,125 µg/ml w przypadku szczepu H37Rv oraz 8 µg/ml w przypadku szczepu Spec. 210 dla pochodnych tiosemikarbazonowych, natomiast dla pochodnych iminowych wartości te wynosiły odpowiednio 0,0312 µg/ml oraz 2 µg/ml.” Powyższe zdanie wymaga wyjaśnienia; co Autorka miała na myśli pisząc, że wartości MIC leku referencyjnego były inne dla pochodnych tiosemikarbazonowych, a inne dla pochodnych iminowych? Szkoda, że nie zamieszczono wartości MIC dla leku referencyjnego w odpowiednich tabelach.
- str. 206: odnośnik literaturowy [80] to adres strony internetowej, w takim przypadku powinna zostać podana również data dostępu do jej zawartości.

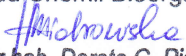
Biorąc pod uwagę doświadczalny charakter pracy na podkreślenie zasługuje szczegółowy opis procedur i pełna charakterystyka nowo zsyntezowanych związków. Poprawność przeprowadzonych interpretacji

widm i przypisania poszczególnych sygnałów nie budzi zastrzeżeń, choć mam uwagę dotyczącą drobnych nieścisłości w opisie sygnałów protonów w kilku widmach ^1H NMR; np. jeżeli w widmie związku **71** (str. 167) Autorka opisuje sygnał protonu w dwupodstawionym pierścieniu pirydyny przy 7,44 ppm jako dublet dubletów (dd) i podaje odpowiednie stałe sprzężenia ($J = 7,5$ Hz oraz 3,5 Hz), to w dwóch sygnałach sprzęgających się z nim protonów opisanych jako dublety (d) przy 7,90 i 8,47 ppm należy oczekiwać tych samych stałych sprzężenia, natomiast w opisie przedstawionym przez Doktorantkę pojawiają się inne wartości (odpowiednio $J = 1,5$ Hz oraz 5,5 Hz). Podobny brak korelacji zauważyć można w opisie widm związków **68** i **72**.

Jednocześnie pragnąc podkreślić, że wspomniane uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają merytorycznej strony dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko, a jedynie mają zachęcić Doktorantkę do głębszej analizy wskazanych zagadnień. Mgr inż. Dagmara Ziembicka wykazała się kreatywnością w planowaniu zadań i rozwiązywaniu problemów badawczych oraz doborze odpowiednich metod analitycznych. Udowodniła, że potrafi stawiać hipotezy badawcze, logicznie planować prace eksperymentalne, a następnie konsekwentnie je realizować.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca mgr inż. Damgary Ziembickiej spełnia kryteria ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (*Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce; Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami*). Wnoszę zatem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

KIEROWNIK
Zakładu Chemii Bioorganicznej

prof. dr hab. Dorota G. Piotrowska

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

Łódź 15 listopada 2023

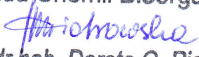
Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Dagmary Ziembickiej zatytułowanej
„Synteza, struktura i aktywność przeciwprątkowa nowych amidrazonowych pochodnych
pirydyny i pirazyny”

Niniejszym zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Dagmary Ziembickiej wnosi istotny wkład w rozwój nauk farmaceutycznych. W ramach prowadzonych prac poszerzono bibliotekę opisanych związków o aktywności przeciwprątkowej. Mgr Inż. Dagmara Ziembicka udowodniła, że potrafi w sposób przemyślany i systematyczny planować kolejne etapy prac badawczych, tak aby skutecznie rozwiązywać problemy naukowe. Przeprowadzone zostały wielokierunkowe badania obejmujące opracowanie efektywnych metod syntezy potencjalnych inhibitorów wzrostu szczepów *Mycobacterium tuberculosis* w grupie podstawionych pochodnych pirydyny i pirazyny z ugrupowaniem tiosemikarbazonowym, ocenę ich właściwości biologicznych oraz przeprowadzenie analizy struktura-aktywność w grupie badanych połączeń. Na podkreślenie zasługuje aspekt aplikacyjny, Doktorantka wyselekcjonowała bowiem dwa związki, które wykazują wysoką zdolność hamowania wzrostu szczepów *Mycobacterium tuberculosis*, przy jednoczesnym braku aktywności wobec badanych szczepów mikroorganizmów oraz brak toksyczności wobec komórek prawidłowych. Biorąc pod uwagę powyższe otrzymane przez Doktorantkę pochodne w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne leki tuberkulostatyczne.

Część zaprezentowanych wyników została opublikowana w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o sumarycznym współczynniku oddziaływań $IF = 13,372$ (*Acta Cryst. C* **2023**, *C79*, 283 – 291; *Materials* **2023**, *16*, art. ID 448, 1 – 19; *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, art. ID 1267, 1 – 15; *Materials* **2022**, *16*, art. ID 5513, 1 – 16; *Acta Cryst. C* **2020**, *C76*, 673 – 680).

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-mail: dorota.piotrowska@umed.lodz.pl
www.umed.pl