



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

p. mgr inż. Dagmary Ziembickiej, pt. „ Synteza, struktura i aktywność przeciwprątkowa nowych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny”

Przedłożona do zrecenzowania rozprawa doktorska pani **mgr inż. Dagmary Ziembickiej** została wykonana w ramach kooperacji dwóch ośrodków uniwersyteckich: Katedry i Zakładu Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Zespołu Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii, Wydziału Chemicznego, Politechniki Łódzkiej, pod kierunkiem pań Promotor, reprezentujących powyższe Jednostki, odpowiednio - **p. prof. dr hab. Katarzyny Gobis** i **p. dr hab. Małgorzaty Szczesio, prof. PŁ.** Ponadto badania aktywności biologicznej *in vitro* przeprowadzono w ramach współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Praca doktorska została sporządzona w formie tradycyjnej dysertacji, zaś jej wyniki zostały w międzyczasie opublikowane w 5 artykułach na łamach międzynarodowych czasopism JCR, o łącznym współczynniku IF=13.372 (MEiN: 700), spośród których w trzech Doktorantka pełni rolę pierwszego Autora, czyli:

1. **Ziembicka Dagmara**, Olczak Andrzej, Gobis Katarzyna, Korona-Głowniak Izabela, Pietrzak Anna, Augustynowicz-Kopeć Ewa, Głogowska Agnieszka, Zaborowski Marcin, Szczesio Małgorzata. Synthesis, structure, ADME and biological activity of three 2,6-disubstituted thiosemicarbazone derivatives. *Acta Cryst. C*, **2023**, C79, 283-291, IF: 0.8 (MEiN: 140.000)
2. **Ziembicka Dagmara**, Gobis Katarzyna, Szczesio Małgorzata, Olczak Andrzej, Augustynowicz-Kopeć Ewa, Głogowska Agnieszka, Korona-Głowniak Izabela, Bojanowski Krzysztof. Synthesis and structure-activity relationship of 2,6-disubstituted thiosemicarbazone derivatives of pyridine as potential antituberculosis agents. *Materials* **2023**, 16, ID 448, s. 1-19, IF: 3.4 (MEiN: 140.000)
3. **Ziembicka Dagmara**, Gobis Katarzyna, Szczesio Małgorzata, Augustynowicz-Kopeć Ewa, Głogowska Agnieszka, Korona-Głowniak Izabela, Bojanowski Krzysztof. Synthesis and biological activity of piperidinothiosemicarbazones derived from aminoazinecarbonitriles. *Pharmaceuticals* **2023**, 16, ID 1267, s. 1-15, IF: 4.6 (MEiN: 140.000)
4. Gobis Katarzyna, Szczesio Małgorzata, Olczak Andrzej, Mazerant-Politowicz Ida, **Ziembicka Dagmara**, Pacholczyk-Sienicka Barbara, Augustynowicz-Kopeć Ewa, Głogowska Agnieszka, Korona-Głowniak Izabela, Fruziński Andrzej. *N'*-substituted 4-phenylpicolinohydrazonamides with thiosemicarbazone moiety as new potential antitubercular agents: synthesis, structure and evaluation of antimicrobial activity. *Materials* **2022**, 15, ID 5513, s. 1-16, IF: 3.4 (MEiN: 140.000)
5. Szczesio Małgorzata, Gobis Katarzyna, Korona-Głowniak Izabela, Mazerant-Politowicz Ida, **Ziembicka Dagmara**, Foks Henryk, Główka Marek, Olczak Andrzej. Synthesis, structure and biological activity of four new picolinohydrazonamide derivatives. *Acta Cryst. C* **2020**, C76, 673-680, IF: 1.172 (MEiN: 140.000)

Oprócz tego Doktorantka jest współautorem jeszcze czterech publikacji oraz 15 polskich i 4 zagranicznych zgłoszeń konferencyjnych, co daje łączny współczynnik IF~30 (MiEN: 1180). **W świetle powyższych parametrów bibliometrycznych, istotna aktywność**

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

naukowa p. mgr inż. Dagmary Ziembickiej w pełni kwalifikuje ją do ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Kolejnym ważnym składnikiem „przepustki” do awansu naukowego p. mgr inż. Dagmary Ziembickiej, jest wybór tematyki badawczej. Doktorat skoncentrowany jest nad poszukiwaniem innowacyjnego leku w walce z gruźlicą. Pomimo utartego przekonania, że mamy już za sobą epokę „Czarodziejskiej góry” Thomasa Manna, która odeszła w cień wraz z nastaniem ery antybiotykowej, pozornie opanowane prątki co pewien czas dają o sobie znać ze zwiększoną siłą. Brzemienno w skutkach renesans gruźlicy szczególnie dał się we znaki pod koniec XX wieku w związku z rozprzestrzenieniem HIV/AIDS, a kolejny raz w ostatnich latach – w towarzystwie COVID-19, kiedy to zgodnie ze statystykami *Global Tuberculosis Report*, liczba zachorowań na TB-COVID-19 osiągnęła wartość 7.12 mln (2019), zaś globalna populacja zakażonych gruźlicą w roku 2022 wyniosła prawie 8 mln (7.95 mln). Mimo wysokiego i wciąż rozwijającego się poziomu antybiotykoterapii, skuteczne pokonywanie *Mycobacterium tuberculosis*, w obliczu jeszcze prężniej rozwijających się mechanizmów lekooporności bakteryjnej, nie przestaje być sztandarowym wyzwaniem współczesnej medycyny. Mając to na względzie, wszelkie racjonalne działania naukowe w tym kierunku wpisują się złotą zgłoską w rozwój nauk medycznych i farmaceutycznych w skali globalnej.

Tym samym pragnę podkreślić trafność wyboru obszaru tematyki badawczej niniejszej dysertacji w kontekście reprezentowanej dyscypliny, a nawet dziedziny naukowej.

Sam wybór tematyki, to jednak dopiero inicjalny składnik sukcesu projektu badawczego, dla którego kamieniem węgielnym są racjonalne założenia, a następnie odpowiedni dobór narzędzi badawczych, umiejętność ich wykorzystania, krytycznej analizy wyników i wyciągnięcia konstruktywnych wniosków po każdym etapie realizowanych zadań badawczych.

Po zapoznaniu się z dysertacją, pragnę wysoko ocenić również i nadmienione składniki niewątpliwego sukcesu badawczego niniejszego doktoratu, dla których podwalinami była dogłębnie przeprowadzona analiza problemu, przedstawiona przejrzyste w 2-stronicowym *Wprowadzeniu* oraz *Części teoretycznej* pracy. Pani mgr inż. Dagmara Ziembicka scharakteryzowała w nich obecny stan leczenia gruźlicy, ze szczególnym uwzględnieniem aktualnych kierunków farmakoterapii, przegląd stosowanych leków wraz z mechanizmami lekooporności, główne trendy we współczesnym poszukiwaniu leków przeciwgruźliczych z przykładami związków w fazie badań przedklinicznych, by mocniej zaakcentować kwestię projektowania leków hybrydowych oraz znaczenie badań krystalograficznych w kontekście leku przeciwgruźliczego. Te dwa

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

ostatnie aspekty, bowiem, przyświecały *Założeniom i Badaniom własnym* jej doktoratu.

W celu racjonalnego zaprojektowania nowych hybrydowych leków przeciwgruźliczych, Doktorantka wytypowała cechy farmakoforowe występujące w tych dostępnych na rynku farmaceutycznym, czyli pierścień pirydyny obecny np. w izoniazydzie, pirazyny w pirazynamidzie, ugrupowanie amidrazonu (delpazolid) czy nawiązującego doń bioizosterycznie ugrupowania tiosemikarbazonu - typowego dla popularnego, zwłaszcza w krajach afrykańskich, tiacetazonu. Głównym założeniem doktoratu była próba kompilacji tych cech farmakoforowych wraz z systematyczną modyfikacją w dwóch antypodalnych fragmentach cząsteczki, w celu wytypowania potencjalnych kandydatów na leki przeciwpłatkowe wśród dipodstawionych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny.

W związku z kluczową rolą struktury przestrzennej aktywnego składnika leku w oddziaływaniu z celami białkowym warunkującymi pożądaną aktywność przeciwgruźliczą, a także z możliwościami przyjmowania różnej formy i konformacji przestrzennej połączeń amidrazonowych (czy tiosemikarbazonowych) uwarunkowanych tautomerią, drugim istotnym założeniem doktoratu były wsparte analizą krystalograficzną, dogłębne badania na strukturą 3D zaplanowanych połączeń chemicznych. Uwieńczeniem, zaś prac chemicznych, miał być skrining aktywności biologicznej *in vitro*, umożliwiającą weryfikację poprawności zaplanowanych modyfikacji strukturalnych oraz przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność.

W tym miejscu pragnę wyrazić mój aplauz dla przejrzyste skonstruowanych, logicznych założeń pracy silnie korespondujących z najnowszymi trendami chemii medycznej w poszukiwaniu leku przeciwgruźliczego.

Jak wynika z rozdziałów 4-7 niniejszej dysertacji, Doktorantka dzielnie sprostала wszystkim postawionym założeniom, wykazując przy tym wysoki poziom wiedzy i umiejętności chemicznych w zakresie chemii organicznej, krystalografii i chemii medycznej. Skutecznie przeprowadziła syntezę chemiczną 120 nowych połączeń, podzielonych na 6 kategorii chemicznych, w tym: (i) tiosemikarbazonowe pochodne pirazyny (3–6) i pirydyny (7–10) z atomem chloru w pozycji C6, (ii) 6-podstawionych pochodnych pirazyno-2-karbonitrylu (11–14) i pikolinonitrylu (15–18), (iii) 6-podstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny (19–34) i pirydyny (35–50), (iv) 2,4-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny (52–55, 57–60), (v) amidrazonów (61–72) oraz (vi) dipodstawionych iminowych pochodnych pirazyny (73–92) i

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

pirydyny (**93–120**). Wykorzystała przy tym różnorodne metody syntezy, min.: konwersję nitryli do iminoestrów w obecności metanolanu sodu lub DBU, substytucję nukleofilową atomu chloru w pierścieniu heteroaromatycznym z wykorzystaniem amin II-rzędowych lub fenoli; kondensacje nitryli z odpowiednimi karbotiohydrazdami, czy reakcję amidrazonów z aldehydami (w metanolu z użyciem DBU).

Na szczególne uznanie zasługują szeroko zakrojone badania eksperymentalne nad strukturą otrzymanych połączeń, służące nie tylko potwierdzeniu tożsamości związku, ale też jego preferowanej formy tautomerycznej. W badaniach oprócz analizy elementarnej, IR i prostych widm $^1\text{H-NMR}$ w temperaturze pokojowej, wykorzystwała widma zmiennotemperaturowe (w CDCl_3), a wynikające z nich obserwacje na temat stabilności tautomerów wsparła zaawansowanymi obliczeniami z wykorzystaniem metod DFT w oprogramowaniu *Gaussian* (DFT: B3LYP). Ponadto przeprowadziła rentgenostrukturalną analizę monokryształów wspartą widmami $^{15}\text{N-NMR}$ w fazie stałej metodą CP MAS (ang. *cross polarization magic angle spinning*) oraz metodą GIPAW (ang. *gauge including projected augmented wave*) umożliwiającą uwzględnienie periodyczności sieci krystalicznej.

Zawarty w dysertacji raport z prowadzonych badań syntetycznych i strukturalnych jest przepleciony bogatą i logicznie skonstruowaną dyskusją, świadczącą o dużej wiedzy chemicznej Doktorantki i dogłębnym zrozumieniu tematu. Jak wynika z kontekstu dysertacji, tej wiedzy towarzyszą również duże umiejętności eksperymentalne, czego potwierdzeniem jest uzyskanie wszystkich zaplanowanych połączeń chemicznych, a aż 35 spośród nich w postaci wysokiej jakości kryształów umożliwiających analizę rentgenograficzną.

Dane oraz rzeczowo sporządzone opisy w rozdziałach „5. Omówienie wyników badań biologicznych” oraz „6. Analiza struktura-aktywność” dowodzą, z kolei, wiedzy Doktorantki w szerszym aspekcie nauk farmaceutycznych wykraczających poza ramy chemiczne w obszary mikrobiologii i cytologii, a także na cenną umiejętność kompilacji zdobyczy obu obszarów wiedzy dla analizy zależności struktura-aktywność, kluczowej dla racjonalnego projektowania leku.

Wysoko, zatem, oceniam interdyscyplinarną, choć z dużą przewagą chemii, wiedzę oraz umiejętności Doktorantki wpasowujące się w dyscyplinę nauk farmaceutycznych, a więc i promujące do ubiegania się o stopień doktora w tej dyscyplinie.

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



Ostatnią ważną komponentą, kwalifikującą p. mgr inż. Dagmarę Ziembicką do awansu na stopień doktora, jest znaczenie prowadzonych przez nią badań w kontekście rozwoju terapii gruźlicy. Racjonalne założenia tego doktoratu zostały uwieńczone niewątpliwym sukcesem na poziomie wstępnego skriningu biologicznego, niosącym duże nadzieje terapeutyczne ze względu na wysoką aktywność przeciwbakteryjną uzyskanej serii, obserwowaną w szczególności w szczepie lekoopornym *M. tuberculosis*. Należy podkreślić, że 40 uzyskanych połączeń hamowało wzrost lekoopornego szczepu (Spec.201) w dawkach poniżej 5 µg/ml, deklasując referencyjny izoniazyd (8 µg/ml), a sześć spośród nich (**44, 45, 54, 84, 88, 116**) wykazało MIC = 0,5 µg/ml. Ponadto związki **45** i **88** cechowała wysoka selektywność działania w odniesieniu do panelu typowych patogennych szczepów Gram+ i Gram- oraz drożdży, zaś związki **44** i **116** w odniesieniu do szczepów Gram-, posiadały przy tym wysokie bezpieczeństwo w teście cytotoksyczności w linii komórkowej HaCaT. Powyższe związki, wraz z dogłębną charakterystyką strukturalną, profilu działania biologicznego wzbogaconego starannie przeprowadzoną analizą zależności struktura-aktywność, stanowią cenne źródło struktur wiodących do dalszych modyfikacji i rozwoju badań w poszukiwaniu kandydata na innowacyjny lek przeciwgruźliczy.

Osiągnięcia naukowe niniejszej dysertacji w istotnym stopniu partycypują w rozwój polskich i globalnych nauk farmaceutycznych skoncentrowanych na udoskonalaniu terapii chorób zakaźnych.

Pod względem redakcyjnym dysertacja stanowi 221-stronicowe dzieło, hojnie udekorowane estetyczną szatą graficzną w postaci 86 rysunków, 54 Tabel i 12 Schematów. W tworzeniu swojego dzieła Doktorantka odniosła się do 213 pozycji literaturowych. Niewątpliwym przymiotem dysertacji jest wysoka staranność stylistyczna, gramatyczna i ortograficzna. Udało mi się znaleźć jedynie nieliczne poniższe niedostatki:

1. Na schemacie 8 zabrakło hydrazyny nad górną strzałką
2. Str.68 – „Jedynym wyjątek był związek **39** krystalizowany z mieszaniny”
3. Str. 193 – „Natomiast bezpieczeństwo ich stosowania przeprowadzano w testach cytotoksyczności” – proponowałabym „oceniono”

W dysertacji zabrakło mi natomiast następujących informacji, o których uzupełnienie prosiłabym w czasie obrony:

1. **Danych na temat źródeł finansowania szeroko zakrojonych prac eksperymentalnych opisanych w dysertacji. Być może Doktorantka kierowała lub była wykonawcą w stosownym granicie.**

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

2. Danych na temat osób uczestniczących w opisanych eksperymentach. W podziękowaniach wymienione są tylko Panie Promotor. Czy to oznacza, że wszystkie eksperymenty (także testy biologiczne) zostały wykonane wyłącznie przez Doktorantkę?
3. Ciekawa jestem też dalszych kierunków badań dla „hitów” (44, 45, 88, 116) zidentyfikowanych w dysertacji, czy podjęto dla nich szersze badania profilu farmakologicznego lub ADMET?

Reasumując, wymienione drobne przeoczenia nie umniejszają mojej wysokiej oceny niniejszej dysertacji, którą cechuje znakomity poziom naukowy, tak pod względem przeprowadzonych eksperymentów, jak i profesjonalnej analizy i dyskusji uzyskanych wyników. W mojej opinii zarówno dorobek publikacyjny, jak i wiedza i umiejętności Doktorantki wykazane w dysertacji w pełni promują Ją do uzyskania stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie.

Niniejsza rozprawa doktorska spełnia, zatem, warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r., poz. 574 ze zm.)

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pani mgr inż. Dagmary Ziembickiej do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na względzie wysoki poziom badań chemicznych oraz istotny wkład tych badań w rozwój nauk farmaceutycznych w poszukiwaniu leków dla terapii gruźlicy, a także międzynarodowy zasięg tych badań wyrażony autorstwem 5 publikacji JCR (w tym trzech pierwszego autorstwa Doktorantki) wnioskuję o wyróżnienie tej pracy doktorskiej.

Kraków, 14 listopada 2023

Katedra i Zakład Technologii
i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM

prof. dr hab. inż. Jadwiga Handzlik
kierownik

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl