



Siedlce, 20.11.2023

Dr hab. inż. Zbigniew Karczmarzyk, prof. uczelni
Instytut Nauk Chemicznych
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet w Siedlcach
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Dągmary Ziembickiej zatytułowanej „*Synteza, struktura i aktywność przeciwprątkowa nowych amidrazonowych pochodnych pirydyny i pirazyny*”

Rozprawa doktorska mgr Dągmary Ziembickiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Katarzyny Gobis i dr hab. inż. Małgorzaty Szczesio, prof. uczelni w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Zespole Rentgenografii Strukturalnej i Krystalochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej w Łodzi. Rozprawa doktorska ma charakter interdyscyplinarny, a podjęta przez Doktorantkę tematyka pracy wpisuje się w bardzo aktualny nurt badań polegających na poszukiwaniu nowych bardziej efektywnych i bezpieczniejszych chemioterapeutyków wykazujących działanie przeciwprątkowe, które z uwagi na pojawiającą się oporność różnych szczepów prątków gruźlicy mogłyby zastąpić bądź uzupełnić szeroko stosowane obecnie leki w terapiach antybiotykowych gruźlicy.

Rozprawa doktorska mgr Dągmary Ziembickiej zajmuje 221 stron i napisana jest w klasycznym układzie treści: wprowadzenie – 2 strony, część teoretyczna – 33 strony, cel pracy – 3 strony, badania własne – 153 strony, piśmiennictwo – 21 stron i 225 pozycji literaturowych. Rozprawa ilustrowana jest 86 rysunkami i 12 schematami oraz zawiera 55 tabel. W pracy zamieszczony jest wykaz skrótów użytych w rozprawie, oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Część teoretyczna rozprawy doktorskiej poświęcona jest zagadnieniom związanym z gruźlicą jako chorobą społeczną i obejmuje: (i) charakterystykę obecnie stosowanego schematu leczenia, stosowanych leków przeciwgruźliczych, ich mechanizmów i celów działania wraz z kodującymi je genami; (ii) omówienie nowego innowacyjnego podejścia do odkrywania leków przeciwgruźliczych obejmującego zmianę przeznaczenia leku, terapię ukierunkowaną na gospodarza, wykorzystanie nanocząstek w systemach dostarczania leków; (iii) kliniczne perspektywy leków przeciwgruźliczych z charakterystyką strukturalną, aktywności przeciwprątkowej i mechanizmu działania wybranych leków znajdujących obecnie w fazie badań klinicznych i przedklinicznych; (iv) projektowanie leków hybrydowych z wykorzystaniem pirydyny, pirazyny i ugrupowania amidrazonowego jako potencjalnych układów farmakoforowych. Ponadto w części teoretycznej rozprawy scharakteryzowano metody badań krystalograficznych, w tym rentgenowską analizę strukturalną kryształów, jako nieocenione narzędzie w projektowaniu i odkrywaniu nowych leków. Dokonano także przeglądu bazy danych krystalograficznej CSD (Cambridge Structural Database) pod kątem zdeponowanych w bazie struktur krystalicznych pochodnych amidrazonowych, ujawniając w dwóch przeglądach 27 struktur zawierających układ tiosemikarbazonu z fragmentem pirazynowym lub pirydynowym oraz 10 struktur analogów pochodnych iminowych. Niewielka liczba znajdujących się w bazie CSD struktur z układem amidrazonowym w pełni uzasadnia celowość podjęcia szeroko zakrojonych badań strukturalnych z wykorzystaniem metody dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego nad tą grupą związków. Na podkreślenie zasługuje fakt, że treści przedstawione w części literaturowej pracy są bardzo ściśle związane z celem pracy oraz zasadniczą częścią pracy prezentującą wyniki badań własnych i są dobrze udokumentowane ponad 150 cytowanymi pozycjami literaturowymi obejmującymi prace naukowe głównie z kilku ostatnich lat.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych związków, potencjalnych leków przeciwprątkowych o strukturze dipodstawionych amidrazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny na drodze weryfikacji roboczej hipotezy badawczej zakładającej, że obecność dużego płaskiego układu strukturalnego stabilizowanego wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi jest odpowiedzialna za aktywność przeciwprątkową. Pierwszy etap do realizacji celu to synteza trzech serii nowych związków obejmujących odpowiednio 2,6-dipodstawione tiosemikarbazonowe pochodne pirazyny i 2,6- i 2,4-dipodstawione tiosemikarbazynowe pochodne pirydyny. Kolejne trzy serie związków to 2,6-dipodstawione pochodne pirazyny oraz 2,6- i 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny, w których ugrupowanie $\text{NH}(\text{C}=\text{S})$ układu tiosemikarbazonowego zastąpione zostało

ugrupowaniem iminowym. Kolejne etapy realizacji celu to wyznaczenie struktury krystalicznej i molekularnej wybranych zsyntetyzowanych pochodnych oraz zbadanie *in vitro* aktywności tuberkulostatycznej, przeciwdrobnoustrojowej i cytotoksycznej, co pozwoliło na wskazanie struktur wiodących w wyniku przeprowadzonej analizy SAR. Przedstawiony w rozprawie doktorskiej zakres badań i metodyka pracy nie budzi zastrzeżeń i świadczy o poprawnej i bardzo dobrze przemyślanej koncepcji przeprowadzenia badań prowadzących do osiągnięcia założonego celu.

W rozdziale rozprawy doktorskiej „Badania własne” przedstawiono syntezę zaplanowanych do otrzymania sześciu serii amidrazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny oraz wyniki badań strukturalnych otrzymanych z zastosowania metod rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów.

Zaprojektowano i wykonano syntezę 120 w zdecydowanej większości nowych związków, w tym 96 stanowiących produkty końcowe wychodząc z komercyjnie dostępnych 6-chloropirazyno-2-karbonitrylu, 6-chloropikolinonitrylu oraz 4-chloropikolinonitrylu. Struktury otrzymanych pochodnych amidrazonowych zostały potwierdzone przez analizę elementarną, użyte metody spektroskopowe IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹⁵N CP MAS, a także metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej. W opisie syntezy i identyfikacji jej produktów dla niektórych związków przedstawiono szczegółową analizę widm uzyskanych wybranymi metodami spektroskopowymi.

Badaniami strukturalnymi z wykorzystaniem metod rentgenowskiej analizy strukturalnej monokryształów objęto 35 związków, w tym 22 pochodne tiosemikarbazonowe (osiem 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny, dwanaście 2,6-dipodstawionych pochodnych pirydyny i dwie 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny) oraz 13 pochodnych iminowych. (dziewięć 2,6-dipodstawionych pochodnych pirazyny, cztery 2,6- i 2,4-dipodstawione pochodne pirydyny). Analiza dołączonych do rozprawy plików CIF oraz raportów CheckCIF potwierdza poprawność rozwiązania struktur krystalicznych zgodnie z przyjętymi standardami dla tego rodzaju badań. Uzyskanie kryształów i zbadanie 35 struktur molekularnych i krystalicznych należy uznać za duże osiągnięcie Doktorantki biorąc pod uwagę także fakt, że w bazie danych strukturalnych CSD, zgodnie z kryteriami przeszukania bazy zamieszczonymi w rozprawie, zdeponowanych jest 27 struktur organicznych z układem tiosemikarbazonu oraz 10 struktur będących pochodnymi iminowymi. Badania rentgenowskie wskazały formę tautomeryczną zwitterionową jako dominującą w stanie krystalicznym obserwowaną dla 20 z 22 przebadanych pochodnych tiosemikarbazonowych oraz konfigurację E obserwowaną w 12 z 13 przebadanych pochodnych iminowych. Przeprowadzono

szczegółową analizę oddziaływań obserwowanych w kryształach badanych związków, w tym przede wszystkim wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych stabilizujących obserwowaną w kryształach formę tautomeryczną i konformację cząsteczki oraz międzycząsteczkowych wiązań wodorowych determinujących upakowanie cząsteczek w komórce elementarnej posługując się notacją grafową Bernsteina. Notacja ta określa m. in. motywy strukturalne tworzone przez cząsteczki związane międzycząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi oraz ilość centów protono-donorowych i protono-akceptorowych zaangażowanych w tworzenie tych wiązań. Uzyskane z badań rentgenowskich dane strukturalne zostały wykorzystane w analizie SAR wiążącej je z aktywnością biologiczną badanych związków.

Otrzymane w wyniku syntezy nowe związki poddano badaniom aktywności przeciwprątkowej na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv i Spec. 210 wykazujących oporność na izoniazyd użyty w tych badaniach jako związek referencyjny. Dla związków wykazujących aktywność tuberkulostatyczną wykonano także badania mikrobiologiczne oraz testy cytotoksyczności. W każdej z badanych serii wystąpiły związki wykazujące aktywność przeciwprątkową, a w przypadku niektórych 2,6-dipodstawionych tiosemikarbazonowych pochodnych pirydyny aktywność ta była do 16 razy większa w porównaniu z referencyjnym izoniazidem. Uzyskane wyniki badań biologicznych potwierdziły prawidłowość przyjętego kierunku badań oraz słuszność poczynionych założeń co do aktywności badanych związków.

W rozdziale rozprawy „Analiza struktura – aktywność” Doktorantka podjęła próbę skorelowania w umiejętny sposób wyników badań biologicznych obejmujących aktywność przeciwprątkową, przeciwdrobnoustrojową i cytotoksyczną z cechami budowy cząsteczek pochodnych pirazynowych i pirydynowych, ich właściwościami farmakokinetycznymi oraz z danymi strukturalnymi tych związków uzyskanymi z eksperymentu dyfrakcyjnego. Pozwoliło to na wyłonienie dwóch struktur wiodących dla pirydynowych pochodnych tiosemikarbazonowych i dwóch kolejnych struktur wiodących dla pirazynowych pochodnych iminowych. Znalazło to swoje odzwierciedlenie w podsumowaniu rozprawy doktorskiej, gdzie przedstawione wnioski są w pełni zgodne z wynikami prezentowanych badań i potwierdzają, że cel pracy został zrealizowany. Na uwagę zasługuje także bardzo staranny i przemyślany wykaz cytowanych pozycji literaturowych obejmujący w dużej mierze najnowsze publikacje naukowe w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Rozprawa doktorska mgr Dąmąry Ziembickiej jest napisana bardzo starannie, z dużą dbałością o szczegóły, tym nie mniej Autorce nie udało się uniknąć pewnych drobnych nieścisłości, z których kilka z obowiązku recenzenta pozwolę sobie przytoczyć:

1. Na Rys. 22 (str. 33) pokazana jest struktura związku o kodzie TAYROE, natomiast opis w tekście odnosi się do struktury związku o kodzie TAYRUK.
2. Błąd literowy w podpisie Rys. 20 i 21.
3. Brak w tekście rozprawy odwołania do pozycji literaturowych [106] i [121].
4. W spisie treści brak tytułu podrozdziału „2.2. Nowe podejście do odkrywania leków przeciwwgruźliczych”.

Powyższe uwagi, jak i nieliczne błędy stylistyczne i literowe zauważone w trakcie lektury rozprawy doktorskiej nie wpływają w istotny sposób na moją pozytywną ocenę pracy.

Moje uwagi i pytania dotyczące rozprawy doktorskiej są następujące:

1. Płaskość (konformacja planarna) cząsteczek tiosemikarbazonowych pochodnych pirazyny i pirydyny została przyjęta jako hipoteza robocza, następnie udowodniona w wyniku przeprowadzonych badań, jako ściśle związana z aktywnością przeciwpłatkową. Co było kryterium uznania cząsteczki lub jej fragmentu za płaski (wartość odpowiedniego kąta torsyjnego, wychylenie atomów ze średniej płaszczyzny układu, kąt między średnimi płaszczyznami układu tiosemikarbazonowego i podstawnika etc.)? Szczególnie problem ten jest istotny w przypadku podstawników będących heterocyklicznymi pierścieniami nasyconymi, które płaskie nie są.
2. Przyjęto, że warunkiem aktywności przeciwpłatkowej jest występowanie pochodnych tiosemikarbazonowych pirazyny i pirydyny w formie zwitterionowej stabilizowanej dwoma wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi. W porównaniu z konformacją cząsteczki w formie neutralnej przyjęcie konformacji w formie zwitterionowej wymaga obrotu pierścienia heteroaromatycznego o 180° względem układu tiosemikarbazonowego. Czy podjęto próbę oszacowania wysokości bariery energetycznej dla takiego obrotu, co może się wiązać ze stabilnością formy zwitterionowej w warunkach fizjologicznych? Ten sam problem dotyczy konfiguracji E i Z cząsteczek obserwowanych w pochodnych iminowych.
3. Badania równowag tautomerycznych pomiędzy formą neutralną i zwitterionową dla związków **3** i **6** wykonane metodami eksperymentalnymi w fazie ciekłej oraz stałej z użyciem metod NMR oraz metod rentgenowskich pokazały, że pochodna **3** w roztworze jest mieszaniną obu form, a w ciele stałym przyjmuje formę neutralną, natomiast pochodna **6** w obu fazach występuje w formie zwitterionowej. Dla obu form obliczono także energie metodą DFT w zadanej bazie funkcyjnej. Przyjmując, że obliczenia wykonano dla izolowanej cząsteczki (faza

gazowa) różnica energii pomiędzy analizowanymi formami na korzyść formy zwitterionowej wynosząca około 0.7 kcal/mol dla związku **6** pokazuje, że w fazie gazowej możliwe jest współistnienie obu form, co łatwo wykazać w oparciu o niezdegenerowany rozkład Boltzmann.

4. W raportach poprawności rozwiązania struktur krystalicznych CheckCIF dla związków **44** i **47** występuje ALERT B wskazujący na udokładnienie pozycji niektórych atomów nie-wodorowych z izotropowym i czynnikami temperaturowymi. Jaka była przyczyna przyjęcia takiego modelu struktury molekularnej dla **44** i **47**?

5. Jaka jest przyczyna różnych wartości MIC dla izoniazydu jako związku referencyjnego w badaniach aktywności przeciwpłatkowej dla pochodnych tiosemikarbazonowych (0.125 µg/ml dla szczepu H₃₇Rv i 8 µg/ml dla szczepu Spec. 210) i pochodnych iminowych (odpowiednio 0.0312 µg/ml oraz 2 µg/ml).

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska wnosi istotny wkład do poznania struktur molekularnych oraz aktywności przeciwpłatkowej oraz przeciwdrobnoustrojowej dużych serii pochodnych tiosemikarbazonowych i iminowych pirazyny i pirydyny jako potencjalnych leków z perspektywą stosowania ich w leczeniu gruźlicy.

Tematyka pracy doktorskiej mgr inż. Dagmary Ziembickiej została opublikowana w pięciu artykułach naukowych o sumarycznym IF =13,372 i 700 pkt MEiN:

1. Ziembicka D., Olczak A., Gobis K., Korona-Głowniak I., Pietrzak A., Augustynowicz-Kopeć E., Głogowska A., Zaborowski M., Szczesio M.

Synthesis, structure, ADME and biological activity of three 2,6-disubstituted thiosemicarbazone derivatives

Acta Cryst. 2023, C79, 283-291 (IF=0.8, MEiN=140 pkt.)

2. Ziembicka D., Gobis K., Szczesio M., Olczak A., Augustynowicz-Kopeć E., Głogowska A., Korona-Głowniak I., Bojanowski K.

Synthesis and structure-activity relationship of 2,6-disubstituted thiosemicarbazone derivatives of pyridine as potential antituberculosis agents

Materials 2023, 16, art. ID 448, 1-19 (IF=3.4, MEiN=140 pkt.)

3. Ziembicka D., Gobis K., Szczesio M., Augustynowicz-Kopeć E., Głogowska A., Korona-Głowniak I., Bojanowski K.

Synthesis and biological activity of piperidinothiosemicarbazones derived from aminoazinecarbonitriles

Pharmaceuticals 2023, 16, art. ID 1267, 1-15 (IF=4.6, MEiN=140 pkt.)

4. Gobis K., Szczesio M., Olczak A., Mazerant-Politowicz I., Ziembicka D., Pacholczyk-Sienicka B., Augustynowicz-Kopeć E., Głogowska A., Korona-Głowniak I., Fruziński A.

N'-substituted 4-phenylpicolinohydrazonamides with thiosemicarbazone moiety as new potential antitubercular agents: synthesis, structure and evaluation of antimicrobial activity *Materials*, 2022, 15, art. ID 5513, 1-16 (IF=3.4, MEiN=140 pkt.)

5. Szczesio M., Gobis K., Korona-Głowniak I., Mazerant-Politowicz I., Ziembicka D., Foks H., Głowska M., Olczak A.

Synthesis, structure and biological activity of four new picolinohydrazonamide derivatives *Acta Cryst.* 2020, C76, 673-680 (IF=1.172, MEiN=140 pkt.)

Całkowity dorobek naukowy mgr Dagmary Ziembickiej obejmuje 9 artykułów naukowych o sumarycznym IF=29.786 i 1180 pkt MEiN oraz 19 komunikatów zjazdowych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Dagmary Ziembickiej spełnia wymogi ustawowe określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 r., poz. 742 ze zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku o dopuszczenie mg Dagmary Ziembickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze interdyscyplinarny i innowacyjny charakter rozprawy doktorskiej, bardzo szeroki zakres oraz wysoki poziom zaprezentowanych badań wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

