UNIWERSYTET MEDYCZNY w LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
u. Chodźki 4A, 20-093 Lublin, Tel.: 48(81) 448-72-40
e-mail: monika.pitucha@umlub.pl

Lublin, 04.08.2020r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Malwiny Krause

p.t.„*Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwgruźliczej*"

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Gobis jako promotora

Recenzja została przygotowana na podstawie Uchwały Rady Nauk Farmaceutycznych GUMed z dnia 15.06.2020r. i przedłożona zgodnie z pismem Przewodniczącego Rady Nauk Farmaceutycznych, Pana prof. dr hab. Wiesława Sawickiego z dnia 23 czerwca 2020r. (DWF-481-D-394/2018).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Malwiny Krause obejmuje szeroko pojętą analizę struktura aktywność nowych pochodnych pikolinonitrylu, 1,2,4-triazolu oraz hydrazydowych analogów pochodnych tiosemikarbazydowych oraz iminowych w kontekście aktywności przeciwgruźliczej. Tematyka recenzowanej pracy jest ściśle połączona z prowadzonymi w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego badaniami w zakresie syntezy związków o potencjalnej aktywności biologicznej. Pomimo, iż od wielu lat prowadzone są badania nad opracowaniem nowych leków to nadal brakuje substancji charakteryzujących się dużą skutecznością i selektywnością oraz niską toksycznością. Praca doktorska pani mgr Malwiny Krause doskonale wpisuje się w nurt badań nad wytypowaniem związków będących strukturą wiodącą do badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska autorstwa mgr M. Krause ma formę klasycznej rozprawy. Maszynopis podzielony na 9 rozdziałów: *Wprowadzenie, Część teoretyczna, Cel pracy, Badania własne, Cześć doświadczalna, Wnioski, Streszczenie* (w języku polskim i angielskim), *Wykaz skrótów* oraz *Piśmiennictwo* liczy 177 stron. Cześć teoretyczna licząca 24 strony stanowi wprowadzenie w tematykę prowadzanych badań, badania własne - 48 stron to opis uzyskanych wyników badań i ich konfrontacja z danymi literaturowymi oraz część doświadczalna licząca 58 stron, która stanowi opis zastosowanych procedur. Całość wzbogacona licznymi Rysunkami, Tabelami oraz Schematami. Niewątpliwym atutem pracy są staranne opisy, widma związków oraz schematy reakcji, a wszystko wykonane z dużą starannością i dbałością o szczegóły.

Wybór tematyki i ocena merytoryczna rozprawy

Powszechnie uważa się, że gruźlica jest chorobą związaną z ubóstwem. Niedożywienie, złe warunki mieszkaniowe, duża gęstość zaludnienia częste migracje sprzyjają rozprzestrzenianiu oraz rozwojowi choroby. Istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia gruźlicy jest koinfekcja ludzkim wirusem niedoboru odporności HIV, która sprzyja aktywacji formy latentej i rozwojowi pełnoobjawowej choroby. Problem ten jest szczególnie zauważalny w krajach Afryki.

Leczenie gruźlicy wymaga czasu i polega na podawaniu kilku leków bakteriobójczych oraz sterylizujących. Najczęściej podawane są cztery leki: izoniazyd, rifampicyna, etambutol oraz pirazyanamid. Długotrwały czas terapii skutkuje występowaniem licznymi działań niepożądanych oraz rozwojem oporności wielolekowej. Stosowane leki charakteryzują się wysoką toksycznością oraz wydłużenia czasu terapii nawet do 18 miesięcy, a współczynnik wyleczeń kształtuje się na poziomie 50-70%. Poszukiwanie leków przeciwgruźliczych jest niezwykle trudne nie tylko ze względu na nie do końca poznaną biologię prątków gruźlicy, ale także specyficzną budowę ściany komórkowej prątków, która utrudnia przenikanie związków do wnętrza komórki. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badań doskonale wpisuje się w nurt tych poszukiwań.

Jedną ze strategii poszukiwania potencjalnych leków jest modyfikacja struktur wiodących o elementy istotne dla pożądanej aktywności biologicznej. W „***Części teoretycznej***" Doktorantka scharakteryzowano izoniazyd i jego pochodne, a także opisała związki o aktywności tuberkulostatycznej testowane w różnych fazach badań klinicznych. Ponadto, dokonała przeglądu literatury na temat aktywności przeciwprątkowej związków posiadających w swojej strukturze pierścień pirydyny oraz fragment hydrazynokarbotioamidowy. Wybór i uzasadnienie podjęcia tematyki badawczej dowodzi, że Doktorantka rozumie potrzebę dalszych badań i zna dotychczasowe osiągnięcia w tej dziedzinie. Cześć teoretyczna, obejmująca 36 stron maszynopisu, poparta jest trafnie dobraną bibliografią. Autorka wykazał się umiejętnością doboru źródeł adekwatnych do opisywanych zagadnień.

Całość stanowi doskonałe wprowadzenie w tematykę zaplanowanych badań, a analiza danych literaturowych wskazuje, iż poszukiwania nowych związków posiadających pierścień pirydyny jak i ugrupowanie tiosemikarbazydowe w swojej strukturze jest obiecującym kierunkiem badań.

Zasadniczym „***Celem pracy***" było opracowanie metod syntezy nowych pochodnych pikolinonitrylu o potencjalnej aktywności przeciwgruźliczej. Doktorantka zaprojektowała serie pochodnych o budowie tiosemikarbazydowej i 1,2,4-triazolu oraz modyfikacje strukturalne w obrębie ugrupowania amidrazonowego. Następnie otrzymane związki poddane zostały badaniu aktywności tuberkulostatycznej oraz jakościowej analizie zależności struktura aktywność (SAR). Ostatnim celem było zbadanie badań aktywności cytotoksycznej związków charakteryzujących się najwyższą aktywnością przeciwgruźliczą. Zarówno cel główny jak i cele pośrednie zostały jasno sformułowane i w pełni uzasadnione.

Rozdział *„Badania własne"* zasługuje na szczególna uwagę. Pani mgr M. Krause szczegółowo opisała uzyskane wyniki badań rozpoczynając od syntezy zaprojektowanych związków, poprzez badania aktywności przeciwgruźliczej oraz cytotoksyczności. W ramach pracy doktorskiej Pani mgr Malwina Krause otrzymała imponująca ilość pochodnych pikolinonitrylu (156), które logicznie podzieliła i scharakteryzowała. Struktury nowo otrzymanych związków potwierdziła za pomocą nowoczesnych metod spektroskopowych, a dla trzech związków wykonano analizę rentgenograficzną. Niewątpliwym atutem pracy jest widmo temperaturowe, które nie tylko potwierdziło strukturę związku 12 ale także potwierdziło możliwość występowania tautomerii.

W dalszym etapie otrzymane związki zostały przebadane *in vitro* pod kątem aktywności przeciwgruźliczej na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*: referencyjnym H37Rv oraz szczepie klinicznym izolowanym od pacjentów Spec. 210, który wykazał oporność wobec izoniazydu, rifampicyny, etambutolu oraz kwasu p-aminosalicylowego. Aktywność przeciwprątkowa była wyrażana poprzez minimalne stężenie hamujące (MIC). Wśród badanych związków zauważono znaczną różnicę w aktywności biologicznej. Najwyższą aktywność przeciwprątkową wykazały posiadające pierścień morfoliny. Jedne ze związków wykazywały zadawalającą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec wybranego do badań panelu bakterii G(+), G(-), drożdży oraz prątków. Ich aktywność była porównywalna lub wyższa niż leków referencyjnych. Pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe o najwyższej aktywności tuberkulostatycznej wykazały znikomą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej HDF oraz znacząco silniej hamowały wzrost komórek nowotworowych. Z kolei, pochodne o budowie 1,2,4-triazolu nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec testowanych szczepów bakterii G(+), G(-), drożdży oraz *M. tuberculosis*. Niewątpliwym atutem rozdziału są badania mikroskopowe oraz wyznaczenie współczynnika selektywności.

W celu wyjaśnienia przyczyn różnicy aktywności w poszczególnych grupach związków zostały wyznaczone metodami chemii obliczeniowej wartość log P, moment dipolowy oraz mapy potencjału elektrostatycznego dla wybranych związków. Brakuje informacji czy Doktorantka wykonała obliczenia samodzielnie czy we współpracy. Na podstawie uzyskanych danych Doktorantka dokonała analizy struktura aktywność (SAR). Na podstawie uzyskanych zależności można określić specyficzne cechy cząsteczki badanego związku wpływające na jego aktywność biologiczną. Rozdział opatrzony jest licznymi schematami reakcji, rysunkami, tabelami co znacznie ułatwia a analizę uzyskanych danych.

Procedury syntetyczne nowo zaprojektowanych połączeń oraz metodykę badań biologicznych Doktorantka opisała w *„Części doświadczalnej"*. Substratem do wszystkich zaprojektowanych syntez był dostępny komercyjnie 4-chloropikolinonitryl, który Doktorantka poddała modyfikacjom strukturalnym zarówno w obrębie atomu fluorowca, jak i grupy nitrylowej. W wyniku przeprowadzonych badań mgr M. Krause otrzymała grupę związków o obiecującej aktywności

tuberkulostatycznej, które wykazały znikomą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej HDF oraz znacząco silniej hamowały wzrost komórek nowotworowych. Jeden z otrzymanych związków wyróżnia się bardzo dobrą aktywnością tuberkulostatyczną, dobrym profilem cytotoksycznym i brakiem zmian morfologicznych w komórkach fibroblastów co czyni go dobrym kandydatem do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

Całość stanowi bardzo ciekawe opracowanie. Czytając rozprawę nasuwa się kilka zagadnień wymagających wyjaśnienia.

1. W części teoretycznej, podrozdział 2.3.2 Autorka zatytułowała „Pochodne tiosemikarbazydowe o aktywności przeciwgruźliczej". Określenie *„pochodne tiosemikarbazydowe"* wydaje się nie do końca adekwatne do prezentowanej treści. Struktury przedstawione m. in. na Rycinie 19, 85-87 to raczej pochodne tiosemikarbazonu o czym świadczą tytuły cytowanej przez Doktorantkę bibliografii. Określenie *„pochodne zawierające układ tiosemikarbazydu"* wydaje się, że lepszym określeniem.
2. Jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze podstawników w pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych, amidrazonowych, 1,2,4-triazolu itp.?
3. Wiele z badanych związków jest pochodnymi obecnie stosowanych leków, bądź modulują te same procesy komórkowe. Czy Doktorantka podjęła próbę identyfikacji celów molekularnych dla badanych związków? Czy planowane są takie badania w przyszłości?

Pomimo wspomnianych powyżej wątpliwości, których większość ma charakter całkowicie dyskusyjny, uważam, że pani mgr Malwina Krause przygotowała ciekawą i aktualną pracę doktorską na bardzo dobrym poziomie.

W **podsumowaniu** stwierdzam, że rozprawa doktorska autorstwa mgr Malwiny Krause p.t."Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwgruźliczej" przygotowana pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Gobis prezentuje wysoki poziom merytoryczny i stanowi przykład badań empirycznych opartych na solidnych podstawach teoretycznych realizowanych z wykorzystaniem przejrzyście opisanej metodologii. Otrzymane wyniki umożliwiły jakościową analizę zależności struktura aktywność nowo zsyntezowanych pochodnych oraz pozwoliły określić elementy strukturalne odpowiedzialne za występowanie aktywności i wskazać grupę związków o najwyższym potencjale biologicznym. Doktorantka opanowała wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej niezbędną do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a prezentowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789).

Uwzględniając powyższe wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr farm. Malwiny Krause i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze duży wkład pracy własnej Doktorantki, znaczenie naukowe i praktyczne wykonanych badań, sposób przedstawienia otrzymanych wyników oraz opublikowanie części badań w renomowanym czasopiśmie naukowym - European Journal of Medicinal Chemistry 2020 (IF = 5,572 oraz 140 MNiSW) zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr farm. Malwiny Krause.

Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin, ul. Chodźki 4A
Tel. 81 4487240

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji
M. Pitucha
dr hab. Monika Pitucha

UNIWERSYTET MEDYCZNY w LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
u. Chodźki 4A, 20-093 Lublin, Tel.: 48(81) 448-72-40
e-mail: monika.pitucha@umlub.pl

Lublin, 04.08.2020r.

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Malwiny Krause

p.t.,,*Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwgruźliczej*"

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Gobis jako promotora

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

Uzasadnienie:

Rozprawa doktorska mgr Malwiny Krause porusza aktualne i niezwykle istotne zagadnienie poszukiwania potencjalnych leków. Na podstawie przeprowadzonych przez Doktorantkę badań udało się wytypować związek, który ze względu na bardzo dobrą aktywność tuberkulostatyczną, dobry profil cytotoksyczny, brak zmian morfologicznych w komórkach fibroblastów, wyróżnia się na tle pozostałych związków i jest dobrym kandydatem do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

Mając na uwadze duży wkład pracy własnej Doktorantki, znaczenie naukowe i praktyczne wykonanych badań, sposób przedstawienia otrzymanych wyników oraz opublikowanie części badań w renomowanym czasopiśmie naukowym - European Journal of Medicinal Chemistry 2020 (IF = 5,572 oraz 140 MNiSW) zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr farm. Malwiny Krause.

Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin, ul. Chodźki 4A
Tel. 81 4487240

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji
M. Pitucha
dr hab. Monika Pitucha