Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
dr hab. n. farm. Iwona Elżbieta Głowacka

Łódź, 03 sierpnia 2020 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Malwiny Krause

zatytułowanej *„Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwgruźliczej"*

przedstawiona Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w celu uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Gobis w zespole, który od lat prowadzi badania ukierunkowane na poszukiwanie nowych połączeń o aktywności przeciwgruźliczej. Tematyka realizowana przez mgr Malwinę Krause w ramach przedstawionej pracy doktorskiej wpisuje się w ten nurt badań.

Rozprawa ma układ powszechnie przyjęty dla prac doktorskich i jest podzielona na dziewięć rozdziałów obejmujących: *Wprowadzenie*, *Część teoretyczną*, *Cel pracy*, *Badania własne*, *Część doświadczalną*, *Wnioski*, *Streszczenie w języku polskim i angielskim*, *Wykaz skrótów* oraz *Piśmiennictwo*.

We wprowadzeniu do przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Krause w jasny sposób przedstawiła rys historyczny oraz dane statystyczne dotyczące zachorowalności na gruźlicę. Kolejny rozdział pracy stanowi rzetelne opracowanie literaturowe, w którym Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący leków, zarówno pierwszego i drugiego rzutu, stosowanych w leczeniu gruźlicy, jak również związków o aktywności przeciwgruźliczej ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych zwierających pierścień pirydyny, ugrupowanie tiosemikarbazydowe jak i oba fragmenty strukturalne jednocześnie. Rozdział ten doskonale koreluje z podjętą tematyką badawczą, jednocześnie potwierdzając jej aktualność.

Cele pracy zostały jasno sformułowane i obejmują opracowanie metod syntezy nowych pochodnych pikolinonitrylu oraz ocenę aktywności tuberkulostatycznej, przeciwdrobnoustrojowej oraz cytotoksycznej finalnych związków. W rozdziale tym Doktorantka

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mali: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

w bardzo przejrzysty sposób przedstawia zasadność podjętej tematyki bazując na danych literaturowych jak i wynikach uzyskanych w macierzystej jednostce.

Pani mgr Malwina Krause przedstawiła ambitną pracę doktorską, której realizacja wymagała wielu umiejętności. Obszerny zakres badań wymagał dużej dyscypliny badawczej, którą dostrzegamy w konstrukcji pracy. Należy zwrócić uwagę na logiczne zaplanowanie modyfikacji w obrębie zarówno podstawników w pozycji C4 pierścienia pirydyny jak i ugrupowania tiosemikarbazydowego. Tak zaplanowany tok badań świadczy o dojrzałości naukowej mgr Krauze, która umiejętnie stawia hipotezy badawcze, logicznie planuje prace eksperymentalne, a następnie konsekwentnie je realizuje.

Rozdział *„Badania własne"* został opisany na 51 stronach i jest szczegółowym omówieniem prowadzonych przez Doktorantkę badań, stanowiącym najważniejszą część recenzowanej pracy. Tekst ten został podzielony na dwa podrozdziały: *„Synteza"* oraz *„Aktywność biologiczna"*.

W pierwszej części Autorka skrupulatnie opisuje poszczególne etapy syntez prowadzące do otrzymania zaprojektowanych związków. Prace badawcze mgr Krause rozpoczęła od syntezy 4-podstawionych pochodnych pikolinonitrylu (związki **1-4**), które stanowiły materiał wyjściowy do otrzymania pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych (związki **9-24**), amidrazonowych (**25-32**), oraz 4-podstawionych pikolinianów metylu (**113-116**). Otrzymane pochodne amidrazynowe zostały następnie wykorzystane jako substraty w syntezie pochodnych tiosemikarbazydowych posiadających na końcu łańcucha tiosemikarbazydowego pierwszorzędową funkcję alkiloaminową (**33-64**), jak również w syntezie pochodnych iminowych (**65-80**) oraz 1,2,4-triazolowych. 4-Podstawione pikoliniany metylu (**113-116**) w reakcji hydrazonolizy Doktorantka przekształciła w odpowiednie pikolinohydrazydy, które następnie wykorzystała w syntezie hydrazydowych pochodnych iminowych (**121-136**) oraz hydrazydowych analogów pochodnych cykloalkiloaminotiosemikarbazydowych (**141-156**). W sumie mgr Krause w ramach pracy doktorskiej zsyntetyzowała 156 pochodnych pikolinonitrylu. Strukturę oraz czystość otrzymanych związków Doktorantka potwierdziła wynikami analizy spektralnej (^{1}H NMR, IR) i elementarnej. Dla wybranych związków wykonana została również analiza spektralna ^{13}C NMR oraz rentgenograficzna X-ray. Nie będę w tym miejscu streszczać prac syntetycznych Doktorantki, która zrobiła to w niezwykle przejrzysty i czytelny sposób.

Podrozdział *„Aktywność biologiczna"* poświęcony jest kolejnemu celowi badawczemu jaki postawiła sobie mgr Krauze, a mianowicie zbadaniu zdolności tuberkulostatycznej, przeciwdrobnoustrojowej oraz cytotoksycznej finalnych związków oraz przeprowadzeniu analizy struktura – aktywność.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mail: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Zaplanowane badania aktywności biologicznej zostały zrealizowane we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie oraz firmą Sunny BioDiscovery w Stanach Zjednoczonych.

Badanie aktywności przeciwgruźliczej zostało przeprowadzone na dwóch szczepach *Mycobacterium tuberculosis*, standardowym H37Rv oraz klinicznym izolowanym od pacjentów Spec. 210, który jest szczepem lekoopornym wobec izoniazydu, rifampicyny, etambutolu i kwasu *p*-aminosalicylowego. Najwyższą aktywność tuberkulostatyczną wykazywały pochodne cykloalkiloaminotiosemikarbazydowe, które następnie zostały przebadane pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej na wybranych szczepach bakterii Gram(+), Gram(−) oraz grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candidia*. Przeprowadzone badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej umożliwiły Doktorantce ocenę ich selektywnego działania przeciwprątkowego. Związki **9** i **13-16** o najwyższej aktywności przeciwgruźliczej zostały poddane badaniom pod kątem działania cytotoksycznego na dwóch liniach komórkowych: linii komórkowej fibroblastów ludzkiego naskórka (HDF) oraz czerniaka mysiego (B16-F10). Ponieważ analiza właściwości fizykochemicznych jest szczególnie ważna dla związków, które mają być badane pod względem ich aktywności biologicznej, wyniki w grupie pochodnych tiosemikarbazydowych Autorka uzupełniła analizą ich właściwości fizykochemicznych wyznaczonych metodami obliczeniowymi (logP, moment dipolowy oraz rozkład potencjału elektrostatycznego).

Należy w tym miejscu pochwalić Doktorantkę za bardzo wnikliwą analizę zależności struktura – aktywność, która pozwoliła określić elementy strukturalne odpowiedzialne za występowanie aktywności oraz wybrać związki o najwyższym potencjale tuberkulostatycznym. Podjęty przez Doktorantkę wysiłek eksperymentalny zaowocował wytypowaniem związku **15**, który może stanowić strukturą wiodącą do dalszych badań nad rozwojem leków przeciwgruźliczych.

W *Podsumowaniu pracy badawczej* Doktorantka przedstawiła zrealizowane cele, a na podstawie uzyskanych wyników sformułowała konstruktywne wnioski. Należy podkreślić szeroki zakres wykonanych prac badawczych, które Doktorantka zaplanowała i zrealizowała. Na wysoką ocenę zasługuje również biegłość w analizowaniu wyników oraz wyciąganiu wniosków.

Część eksperymentalna rozprawy to 59-stronicowe opracowanie, w którym Doktoranta przedstawiła szczegółowy opis procedur wykorzystanych do syntezy zaprojektowanych, nowych pochodnych pikolinonitrylu.

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mali: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

Piśmiennictwo w przedstawionej rozprawie doktorskiej obejmuje 153 pozycje, które zostały właściwie dobrane i użyte w pracy. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do badań prezentowanych w rozprawie.

Podkreślić należy, że praca napisana została poprawnym językiem. Na pochwałę zasługuje również przejrzysta szata graficzna, choć nie udało się Doktorantce uniknąć kilku drobnych pomyłek/niejasności oraz błędów edytorskich, o których wspominam z obowiązku recenzenta:

Na stronie 48 Doktorantka rozważa dla amidrazonowych pochodnych równowagę tautomeryczną pomiędzy formą imidową (A) a amidową (B). Z załączonego widma ^{1}H NMR oraz jego opisu wynika, że związek **25** w roztworze DMSO-d_6 występuje w formie hydrazonu amidowego (B) co nie koreluje z tekstem oraz obliczeniami teoretycznymi.

Str.156 „substrat wyjściowy" (materiał wyjściowy, związek wyjściowy ale nie substrat).

W części eksperymentalnej np. dla związku **85** została podana nazwa „2-(1-Metyl-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)-4-fenoksypirydana" zamiast 4-fenoksy-2-(1-metylo-1*H*-1,2,4-triazol-3-ylo)pirydyna.

Poprawność przeprowadzonych dowodów strukturalnych nie budzi wątpliwości, choć mam uwagę dotyczącą nieścisłości w opisie widm ^{1}H NMR tj. sygnałów protonów pierścienia pirydynowego. Jeżeli Doktorantka w widmie np. związku **44** obserwuje dublet z dużą stałą sprzężenia ^3J = 6 Hz pochodzący od protonu oznaczonego w pracy jako (i), to w sygnale sąsiedniego protonu (c) będącego dubletem dubletów musi pojawić się również stała sprzężenia o wartości 6 Hz, natomiast w opisie Doktorantki pojawiają się dwie stałe sprzężenia o wartościach J = 2 i 3 Hz.

Ponadto w opisie widma ^{1}H NMR dla związku **84** wątpliwość budzi wartość stałej sprzężenia protonów pierścienia pirydyny J = 30 Hz.

Uwagi zawarte recenzji w żadnym stopniu nie umniejszają merytorycznej strony dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko. W mojej ocenie wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają bardzo dużą wartość naukową, zarówno w aspekcie poznawczym jak i aplikacyjnym. Dotychczasowe osiągnięcia Doktorantki wskazują, że jest ona naukowcem o wysokim potencjale dalszego rozwoju.

Założony cel pracy został w pełni zrealizowany. Uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań zostały opublikowane w postaci 1 artykułu w czasopiśmie *European Journal of Medicinal Chemistry* (IF = 5.572, 140 pkt. MNiSW), w którym Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto w dorobku naukowym mgr Krause posiada 3 publikacje z tzw. *„listy filadelfijskiej"*, niewchodzące w zakres rozprawy doktorskiej oraz jedno opublikowane

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mali: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

streszczenie zjazdowe. Szkoda, że w pracy zabrakło wykazu doniesień konferencyjnych, otrzymanych nagród oraz ewentualnie udziału w projektach badawczych.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Malwiny Krause spełnia wymagania ustawowe (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz.U. z 2003r. Nr 65, poz. 595 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 badań, aktualność tematyki badawczej oraz potencjalną wartość aplikacyjną uzyskanych wyników, zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o wyróżnienie pracy.

Iwona Głowacka

Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej

90-151 Łódź | ul. Muszyńskiego 1
tel. (042) 677 92 37
e-mali: iwona.glowacka@umed.lodz.pl
www.umed.pl

UNIWERSYTET MEDYCZNY w ŁODZI
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Bioorganicznej i Biokoordynacyjnej
Zakład Chemii Bioorganicznej
90-151 Łódź, ul. Muszyńskiego 1
tel. 42-677-91-39

Pieczątka jednostki organizacyjnej recenzenta

Iwona E. Głowacka
Imię i nazwisko recenzenta

dr hab. n. farm. / prof. uczelni
Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: Malwina Krause

Tytuł pracy doktorskiej:

„Synteza nowych pochodnych pikolinonitrylu o aktywności przeciwprątniczej"

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

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

Uzasadnienie:

Rozprawa doktorska Pani mgr Malwiny Krause stanowi ważną część badań naukowych dotyczących poszukiwania nowych połączeń o aktywności przeciwprątniczej.
Doktorantka w swojej pracy skoncentrowała się na syntezie oraz ocenie aktywności tuberkulostatycznej nowych pochodnych pikolinonitrylu.
Uzyskane wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę na temat elementów strukturalnych determinujących aktywność przeciwprątniczą w tej grupie połączeń.
Mgr Krause wytypowała związek o najwyższej aktywności i najlepszym profilu farmakokinetycznym, który może stanowić strukturę wiodącą do dalszych badań.
W mojej ocenie zaprezentowane w pracy wyniki mają dużą wartość naukową, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym.
Część zaprezentowanych wyników została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (European Journal of Medicinal Chemistry, IF 5.572).

Iwona Głowacka