

Prof. dr hab. n. farm. Monika Wujec  
Katedra i Zakład Chemii Organicznej  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 5.11.2015 r.

#### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Renaty Paprockiej wykonanej w Zakładzie Chemii Organicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Choroby nowotworowe stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów. Liczba zachorowań rośnie w zastraszającym tempie. W 2000 roku na świecie zarejestrowano 10 mln nowych zachorowań, w Polsce 110 tys. Prognozy na rok 2020 są pesymistyczne; szacuje się, iż nowych zachorowań na świecie będzie 20 mln., zaś w samej tylko Polsce 160 tys. Chorzy na nowotwory posiadają obniżoną odporność, wskutek czego są szczególnie narażeni na wszelkiego rodzaju infekcje, w tym szczególności na infekcje bakteryjne. Jak wynika z raportu prof. Ramanana Laxminarayan'a, dyrektora Centre for Disease Dynamics, Economics and Policy w Waszyngtonie, chemioterapeuci, jako druga grupa lekarzy zaraz po chirurgach, bardzo często spotykają się z opornością na antybiotyki. Występuje ona u co czwartego chorego poddanego chemioterapii. Ostatni raport opublikowany we wrześniu w „Lancet” podaje, iż połowa bakterii odpowiedzialnych za zakażenia pooperacyjne jest oporna na antybiotyki. Oporność na bakterie nie oznacza jednak, że chorych nie udaje się skutecznie leczyć, lekarzom zwykle udaje się znaleźć skuteczny antybiotyk dla danego pacjenta. Leczenie trwa jednak znacznie dłużej i jest bardziej kosztowne. Zdarza się jednak, że części pacjentów nie udaje się uratować. Raport podaje ponadto, że dalszy spadek skuteczności antybiotyków o 30 proc., przyczyniłby się do wzrostu zachorowań na zakażenia bakteryjne odporne na antybiotyki o 120 tys. rocznie w samych Stanach Zjednoczonych. Jednocześnie, roczna liczba zgonów z tego powodu zwiększyłaby się o 6 tys.

W odpowiedzi na zagrożenia spowodowane narastającą odpornością bakterii na stosowane leki, w czołowych laboratoriach badawczych prowadzi się intensywne badania w poszukiwaniu nowych związków o silnej aktywności przeciwbakteryjnej.

Poszukiwania te mogą odbywać się na kilka sposobów. Podejście tradycyjne polega na przetestowaniu kilku tysięcy substancji z nadzieją, iż wśród nich trafi się na strukturę aktywną. W dzisiejszych czasach mówimy o racjonalnym projektowaniu leków. Bardzo często mamy wtedy na myśli zaplanowanie eksperymentów i w gruncie rzeczy, przeprowadzenie ich *in silico* poczynając od wyboru celu molekularnego, poprzez identyfikację struktury wiodącej do identyfikacji białek kluczowych. Podejście tradycyjne można porównać do błądzenia we mgle, ale to podejście doprowadziło do odkrycia większości stosowanych leków. Niektórzy twierdzą, że synteza to przeżytek, to strata czasu i pieniędzy, ale ile mamy leków "zaprojektowanych"?

Praca Pani Renaty Paprockiej jest przykładem na to, że synteza wciąż jeszcze ma sens. Doskonale też wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, przeciwzapalnej i przeciwnowotworowej, o strukturach innych niż dotychczas stosowane leki.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników, dyskusję oraz wnioski.

Część wprowadzająca jest poświęcona charakterystyce amidrazonów, zastosowaniu ich do syntez oraz ich aktywności biologicznej. Ponadto, autorka opisuje zastosowanie w lecznictwie pochodnych triazolu oraz, ze względu na jeden z kierunków badań, scharakteryzowała grupę niesterydowych leków przeciwzapalnych.

Celem pracy było przebadanie przebiegu reakcji N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów z bezwodnikiem itakonowym, ustalenie warunków otrzymywania produktów o budowie liniowej i cyklicznej w/w reakcji, wybór amidrazonu do syntezy ligandów z innymi bezwodnikami cyklicznymi, przeprowadzenie otrzymanych ligandów w kompleksy miedzi(II) oraz określenie aktywności biologicznej otrzymanych produktów.

W pierwszym etapie pracy zbadano przebieg reakcji N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów z bezwodnikiem itakonowym w środowisku bezwodnego eteru dietylowego. W zależności od podstawników obecnych w amidrazonach otrzymano pochodne kwasu 2-metylideno-4-oksobutanowego (9-14) lub 1,2,4-triazolu (15-16).

Następnie podjęto próbę cyklizacji otrzymanych związków liniowych w różnych warunkach. W wyniku ogrzewania związków (10-14) w temperaturze wrzenia wody otrzymano z dobrą

wydajnością pochodne kwasu 2-(1,2,4-triazol-3-ylo)metyloprop-2-enowego (18-22). Podczas ogrzewania kwasu 2-metylideno-4-[2{[(4-nitrofenylo)amino](pirydyn-2-ylo)metylideno}hydrazynylo]-4-oksobutanowego (9) w wodnym roztworze ługu sodowego powstał kwas 2-{[4-(4-nitrofenylo)-5-(pirydyn-2-ylo)-4H-1,2,4-triazol-3-ylo]metylo}prop-2-enowy (17). Inny przebieg miała cyklizacja związków (10-11) w środowisku zasadowym - otrzymano pochodne kwasu (E)-3-(1,2,4-triazol-3-ylo)metyloprop-2-enowego (23-24), będące izomerami związków (18-19). Ze względu na łatwość tworzenia kompleksów z miedzią(II) oraz opisaną w piśmiennictwie aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową pochodnych pirydino-2-karbohidrazonamidów do dalszych syntez wybrano amidrazon 2 - N<sup>3</sup>-(pirydyn-2-ylo)pirydino-2-karbohidrazonamid. Doktorantka w reakcji z ośmioma bezwodnikami cyklicznymi: cis-1,2,3,6-tetrahydroftalowym, ftalowym, cis-1,2-cykloheksanodikarboksylowym, bursztynowym, pirydino-2,3-dikarboksylowym, maleinowym i itakonowym otrzymała ligandy (10, 25-30). Reakcje prowadzono w środowisku eterowym, jedynie do syntezy pochodnej kwasu 2-propenowego zastosowano mniej polarny rozpuszczalnik - toluen.

Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdzono za pomocą analizy spektroskopowej (<sup>1</sup>H NMR, IR) oraz krystalograficznej 11 monokryształów. Dodatkowo dla pochodnych 1,2,4-triazolu wykonano badania <sup>13</sup>C NMR oraz MS. Na podstawie analizy widm <sup>1</sup>H NMR stwierdzono, że związki (9-14) o strukturze liniowej i ligandy (25-30) występują w roztworze DMSO w dwóch formach pozostających w równowadze dynamicznej. W wyniku reakcji ligandów (10, 25-30) z octanem miedzi(II) lub chlorkiem miedzi(II) otrzymano kompleksy (31-36). Tożsamość związków kompleksowych ustalono za pomocą analizy rentgenograficznej monokryształów oraz w oparciu o widma w podczerwieni.

Przeprowadzona analiza rentgenostrukturalna wykazała, że ligandy (10, 25-29) występują w ciele stałym w postaci izomeru Z, natomiast w kompleksach (31-36) obecny jest wyłącznie izomer E.

Następnym etapem pracy było wyznaczenie chromatograficznych parametrów lipofilowości zsyntetyzowanych związków za pomocą techniki TLC. Na uwagę zasługuje fakt, iż doktorantka sama wykonała te badania pod kierunkiem Pani Profesor Jolanty Flieger w Zakładzie Chemii Analitycznej Katedry Chemii UM w Lublinie.

Wstępną ocenę właściwości biologicznych otrzymanych związków przeprowadzono w oparciu o zgodność z regułą Lipińskiego oraz wartości powierzchni polarnej cząsteczki (TPSA). Związki (10-30) spełniały warunki „reguły pięciu” oraz charakteryzowały się umiarkowanymi wartościami TPSA, co może świadczyć o ich korzystnych parametrach

farmakokinetycznych. Związki kompleksowe (32-36) nie spełniały reguły Lipińskiego oraz posiadały zbyt dużą powierzchnię polarną cząsteczki, co może znacząco obniżyć ich wchłanianie i przenikanie przez błony biologiczne. Kompleks (31) został wykluczony z badań biologicznych ze względu na słabą rozpuszczalność w DMSO i innych rozpuszczalnikach.

Potencjalną aktywność biologiczną otrzymanych związków przewidziano za pomocą programu PASS Online. Niestety, otrzymane przez doktorantkę wyniki nie zostały potwierdzone badaniami biologicznymi. Myślę, że w dalszej pracy Pani mgr Paprocka pokusi się o sprawdzenie przynajmniej jednego związku w kierunku "wyliczonej" aktywności przeciwwirusowej.

Następnym etapem pracy było przekazanie związków do badań w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Najaktywniejsze związki hamowały w stężeniu 50 µg/ml wzrost gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus*, pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa*, paciorkowca kałowego *Enterococcus faecalis* oraz prątków *Mycobacterium smegmatis*. Opisując wyniki tych badań doktorantka posługuje się stwierdzeniem, że związki wykazują aktywność bakteriostatyczną. Aby stwierdzić czy związki działają bakteriostatycznie czy bakteriobójczo należy obok wartości minimalnych stężeń hamujących MIC wyznaczyć również wartości minimalnych stężeń bójczych MBC.

W Katedrze Immunologii Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w wykonano badania toksyczności nowootrzymanyh związków wobec ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC), wpływu na proliferację w hodowli PBMC stymulowanej przez fitohemaglutyninę (PHA) oraz wpływu na syntezę cytokin prozapalnych TNF- i IL-6 w hodowli PBMC stymulowanej przez lipopolisacharyd (LPS) wykonano. Wyniki tych badań zostały opublikowane w Acta Poloniae Pharmaceutica oraz Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.

Badane związki okazały się być nietoksyczne wobec ludzkich jednojądrzastych komórek krwi (PBMC) w stężeniach do 50 µg/ml. Bardzo silne, porównywalne do ibuprofenu zahamowanie syntezy TNF- rzędu 98% zaobserwowano dla pochodnych triazolu w stężeniu 10 µg/ml. Najsilniejsze zahamowanie syntezy IL-6 (rzędu 35%) wywoływała pochodna triazolu (22) posiadająca podstawnik fenyłowy i 4-nitrofenyłowy. Spośród pochodnych triazolu trzy związki wykazywały silniejszą aktywność przeciwzapalną od pozostałych, daje to podstawę do przeprowadzenia dalszych badań nad określeniem mechanizmu ich działania.

11 związków przekazano do badań w kierunku aktywności przeciwnowotworowej. Nasuwa się tutaj od razu pytanie dlaczego nie wszystkie związki poddano badaniom? Najsilniejszą

aktywność, jednak 7-krotnie niższą niż cisplatyna, wykazywał kwas (2Z)-4-okso-4-{2-(pirydyn-2-ylo)(pirydyn-2-yloamino)metylideno}hydrazynylo)but-2-enowy.

Kompleks (32) w stężeniu 10 g/ml wykazywał istotną aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka okrężnicy CX-1 oraz raka naskórka A-431, natomiast w stężeniu 100 g/ml hamował porównywalnie do cisplatyny proliferację komórek linii nowotworowych L-1210, SW 948, CX-1 i A-431. Jednocześnie, co należy podkreślić, związek 32 jest około pięćdziesięciokrotnie mniej toksyczny od cisplatyny, co stwarza nadzieję, że mógłby się on stać potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym.

Ostatnim etapem badań było przekazanie jednej, wytypowanej pochodnej do badań w kierunku aktywności na OUN. Związek (21) wykazał niską toksyczność oraz słaby wpływ depresyjny na ośrodkowy układ nerwowy myszy. Ponadto w dawce 100 mg/kg i.p. wykazywał aktywność przeciwdrgawkową, natomiast w dawce 12,5-100 mg/kg i.p. istotnie wydłużał czas snu tiopentalowego.


Reasumując, uważam iż praca mgr Renaty Paprockiej jest przykładem bardzo dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Autorka przeprowadziła obszerną dyskusję wyników, wykazując się przy tym umiejętnością wyciągania adekwatnych wniosków.

Praca doktorska mgr Paprockiej napisana jest starannie i nie budzi zastrzeżeń pod względem merytorycznym.

Na podkreślenie zasługuje fakt opublikowania części wyników w 6 artykułach naukowych (wszystkie ze współczynnikiem oddziaływania IF), w czterech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto jest współtwórcą dwóch zgłoszeń patentowych. Wyniki swoich badań prezentowała również w formie komunikatów zjazdowych na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam ją za niezwykle interesującą oraz nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z tym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Renaty Paprockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Kierownik  
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej  
  
Prof. dr hab. Monika Wójcik