



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

KATEDRA BIOCHEMII I CHEMII KLINICZNEJ  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND CLINICAL  
CHEMISTRY

---

**Recenzja pracy doktorskiej „Aktywność biologiczna produktów uzyskanych w reakcji N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów z bezwodnikami cyklicznymi oraz ich wybranych kompleksów z miedzią (II)” mgr Renaty Paprockiej wykonanej w Zakładzie Chemii Organicznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem profesor dr hab. n. farm. Bożeny Modzelewskiej-Banachiewicz**

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera: wykaz skrótów, wprowadzenie, cel pracy, opis badań własnych, część doświadczalną, opis wykonanych badań fizykochemicznych i biologicznych oraz wnioski. Wszystkie wyżej wspomniane rozdziały sformułowane są prawidłowo, jedynie w rozdziale „Cel pracy” Autorka po ładnym przedstawieniu celów bez potrzeby opisuje, co zrealizowała i jak to wykonała.

We wprowadzeniu autorka wyczerpująco charakteryzuje amidrazony, ich zastosowanie do syntez oraz jako ligandy do otrzymywania kompleksów z metalami. Przedstawia znane z piśmiennictwa aktywne substancje zawierające układ amidrazonu i triazolu. Opisując syntezę Doktorantka cytuje źródłowe prace badawcze (44 cytowania), natomiast przy opisie aktywności biologicznej substancji często ogranicza się do cytowania wyłącznie encyklopedycznie zebranego spisu substancji (The Merck Index). Przedstawiony przegląd piśmiennictwa uzasadnia podjęcie przez Autorkę poszukiwania aktywnych biologicznie produktów reakcji amidrazonów.

Cel badawczy obejmował trzy zasadnicze etapy:

1. Zbadanie przebiegu reakcji N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów z bezwodnikiem itakonowym w warunkach umożliwiających syntezę produktów o budowie liniowej oraz ustalenie warunków cyklizacji wyżej wspomnianych związków.

2. Wybór amidrazonu do syntezy ligandów w reakcjach bezwodnikami cyklicznymi, otrzymanie ligandów i przeprowadzenie ich w kompleksy miedzi(II);
3. Określenie aktywności biologicznej uzyskanych związków.

Autorka bardzo dobrze zrealizowała założone cele pracy. Ustaliła przebieg reakcji  $N^3$ -podstawionych amidrazonów z bezwodnikiem itakowym w środowisku eterowym. W zależności od rodzaju użytej pochodnej kwasu otrzymano związki o budowie liniowej 9-14 (pochodne kwasu 2-metylideno-4-oksobutanowego) oraz cykliczne 15-16 (zawierające układ 1,2,4-triazolu). Doktorantka zbadała przebieg reakcji cyklizacji związków liniowych 9-14 w zależności od środowiska. Ogrzewanie związków 9-14 w temperaturze wrzenia wody doprowadziło do powstania pochodnych kwasu 2-(1,2,4-triazol-3-yl)metylprop-2-enowego 17-22. W przypadku związku 17 zmiana warunków cyklizacji ze środowiska wodnego na alkaliczne zdecydowanie poprawiło wydajność reakcji. Zasadowe środowisko reakcji wpłynęło na zmianę produktów cyklizacji 10-11 – otrzymano pochodne kwasu (*E*)-3-(1,2,4-triazol-3-yl)metylprop-2-enowego (23-24), które są izomerami pochodnych 18-19. Autorka na podstawie piśmiennictwa zaproponowała mechanizm przekształcenia związku 11 w 24.

Drugim etapem syntetycznej części pracy był wybór ligandów i otrzymanie kompleksów z jonami miedzi.

Doktorantka na podstawie własnych doświadczeń i danych zebranych z piśmiennictwa wybrała związki z podstawnikami 2-pirydyłowymi. Otrzymała ligandy w reakcji amidrazonu z bezwodnikami: itakowym, *cis*-1,2,3,6-tetraftalowym, ftalowym *cis*-cykloheksano-1,2-dikarboksylowym, bursztynowym oraz pirydyno-2,3-dikarboksylowym.

Do reakcji kompleksowania zastosowała ligandy 10, 25-30 oraz octan miedzi (II) lub chlorek miedzi (II).

Reasumując, Doktorantka uzyskała w swojej pracy łącznie 28 pochodnych stosując jako substraty wyjściowe osiem  $N^3$ -podstawionych amidrazonów.

Struktury otrzymanych związków 9-30 potwierdzono metodami spektralnymi  $^1H$  NMR, IR oraz dla 11 pochodnych analizą rentgenowską. Dla pochodnych 1,2,4-triazolu 15-24 wykonano analizę  $^{13}C$  NMR oraz MS. Strukturę kompleksów miedzi (II) potwierdzono na podstawie widm IR oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej

monokryształów. Na podstawie otrzymanych wyników ustalono, że na strukturę otrzymanego kompleksu wpływa rodzaj użytej soli miedzi (II).

Ważnym elementem warunkującym aktywność biologiczną jest lipofilowość. Doktorantka samodzielnie wyznaczała chromatograficzne parametry lipofilowości stosując technikę TLC.

Wstępną ocenę właściwości biologicznych otrzymanych związków oznaczono w oparciu o zgodność z regułą Lipińskiego oraz wartości powierzchni polarnej cząsteczki (TPSA). Wszystkie nowe związki prócz kompleksów miedzi (II) spełniały reguły Lipińskiego. Natomiast kompleksy posiadały zbyt dużą powierzchnię polarną cząsteczki. Na podstawie wspomnianych badań oraz słabej rozpuszczalności w DMSO związek 31 został wykluczony z dalszych badań.

Potencjalną aktywność biologiczną symulowano za pomocą programu PASS Online. Doktorantka wykazała metodą obliczeniową, że otrzymane związki 9-30 mogą posiadać aktywność przeciwwirusową, wpływać stymulująco na funkcje nerek i proces erythropoezy. Żadna z wyliczonych możliwych aktywności nie została sprawdzona, co podważa sens wykonanych badań.

Dla otrzymanych związków przeprowadzono badania aktywności biologicznej:

- dla wszystkich, wyłączając nierozpuszczalny w DMSO kompleks, oznaczono aktywność przeciwbakteryjną (wobec szczepów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych),
- dla związków 9-24 oraz 26-30 oznaczono toksyczność, aktywność antyproliferacyjną oraz wpływ na stężenie cytokin *in vitro*,
- dla związków 10, 25-30 i kompleksów 32-36 oznaczono aktywność cytotoksyczną wobec wybranych linii komórek nowotworowych,
- dla związku 21 oznaczono wpływ na centralny układ nerwowy myszy.

Otrzymane pochodne charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością wobec szczepów bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. MIC (minimalne stężenia hamujące) dla najaktywniejszych pochodnych wynosiły 50 µg/ml, co jest wartością wielokrotnie wyższą od substancji referencyjnej – tetracykliny. Dla związków zbadano jedynie minimalne stężenie hamujące (MIC), nie oznaczono minimalnego stężenia bójczego (MBC), więc Doktorantka nie jest w stanie stwierdzić czy związki posiadają działanie bakteriostatyczne czy też bakteriobójcze. Zamiast pojęcia aktywność bakteriostatyczna, powinna stosować aktywność przeciwbakteryjna.

Badane związki w stężeniach do 50 µg/ml były nietoksyczne wobec ludzkich jednojądrzastych komórek krwi (PBMC). Bardzo silne, porównywalne do ibuprofenu



zahamowanie syntezy TNF- $\alpha$  rzędu 98% zaobserwowano dla trzech pochodnych triazolu w stężeniach 10  $\mu\text{g/ml}$ . Pochodna triazolu z podstawnikami fenylowym i 4-nitrofenylowym hamowała syntezę IL-6 (35%).

Pochodne triazolu charakteryzowały się silną aktywnością przeciwzapalną, istotne byłoby aby Doktorantka pogłębiła takie badania w dalszej swojej pracy naukowej, ponieważ ten kierunek badań jest najbardziej obiecujący.

Dla wybranych pochodnych oznaczono aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych. Ciekawą aktywnością charakteryzują się jeden z kompleksów. W stężeniu 10  $\mu\text{g/ml}$  wykazywał istotną aktywność wobec komórek raka okrężnicy CX-1 oraz raka naskórka-A-431. Jest pięćdziesięciokrotnie mniej toksyczny od cisplatyny.

Na podstawie wysokiego parametru lipofilowości wybrano jeden związek aby zbadać wpływ na ośrodkowy układ nerwowy myszy. Związek charakteryzował się niską toksycznością, co istotne nie był neurotoksyczny. Wykazywał słaby wpływ depresyjny i przeciwdrgawkowy oraz wydłużał czas snu tiopentalowego.

Podsumowując, chciałabym wskazać zalety pracy:

1. Wnikliwa analiza piśmiennictwa dotyczącego amidrazonów, umożliwiającą Doktorantce sformułowanie celu badań własnych.
2. Otrzymanie pochodnych liniowych, cyklicznych oraz kompleksów z N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów.
3. Przeprowadzenie optymalizacji warunków metod otrzymywania, w celu podniesienia wydajności.
4. Potwierdzenie struktury otrzymanych pochodnych metodami spektralnymi, szczególnie istotne dla pochodnych tworzących izomery *Z/E* oraz związków kompleksowych, ponieważ powstawały trzy rodzaje produktów.
5. Wykonanie badań strukturalnych dla 11 spośród otrzymanych związków. Rentgenowska analiza strukturalna pozwoliła przeprowadzić analizę stereochemii otrzymanych cząsteczek oraz niekowalecyjnych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych.
6. Badanie lipofilowości dla otrzymanych związków oraz symulacja biologicznej aktywności.
7. Poprzez badanie aktywności potwierdzenie celowości otrzymywania pochodnych amidrazonów.

8. Opublikowanie części badań w czasopismach naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania Impact Factor 8,35.

Wady pracy:

1. Nieliczne błędy językowe i niekonsekwencje w nazewnictwie związków.
2. Brak czytelnego uzasadnienia rodzaju przeprowadzonych badań biologicznych, co nie zawsze związane było symulowaną aktywnością. Wydaje również się celowe przeprowadzenie w dalszej pracy badań, które zostały za pomocą obliczeniowych metod, wskazane jako potencjalnie możliwe dla otrzymanych pochodnych (np. badania na aktywność przeciw wirusową).
3. Brak załączonych prac naukowych, jako suplement rozprawy doktorskiej, w których został opublikowany materiał będący częścią pracy doktorskiej.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera elementy nowości naukowej i wnosi wkład do wiedzy na temat syntezy i aktywności biologicznej pochodnych otrzymanych z N<sup>3</sup>-podstawionych amidrazonów. Ma układ logiczny i konsekwentny. Doktorantka wykazała się umiejętnością przeprowadzenia zaprojektowanych syntez, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika 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.

Warszawa, 24. 11. 2015

*Monika Strye*

WARSZAWSKI  
UNIWERSYTET MEDYCZNY  
Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej  
Ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa  
Tel/fax (022) 57-20-735