



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA TECHNOLOGII LEKÓW I BIOTECHNOLOGII FARMACEUTYCZNEJ

ZN-BF 4000. 1. 2020

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO
RADY DYSZYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE

Podpis *J. Joralewska* 24.05.2022

Warszawa, 18.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Łukasza Szczukowskiego

o tytule

Synteza i aktywność biologiczna nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazyjonu

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

pod kierunkiem dr hab. Piotra Świątka, profesora uczelni

Ból i stan zapalny są jednymi z najczęstszych następstw stanu chorobowego. Istnieje wiele leków łagodzących je, najczęściej w tym celu stosuje się niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) z których część jest dostępna w obiegu pozaaptecznym lub są one wydawane bez przepisu lekarza. Niebezpieczne działania niepożądane, które towarzyszą przyjmowaniu zarówno nieselektywnych jak i selektywnych NLPZ, są czynnikami, które w znacznej mierze powinny ograniczać ich przewlekłe stosowanie. Z tej przyczyny cały czas konieczne jest poszukiwanie nowych, skutecznych i bezpiecznych substancji o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym. Ten ważny cel podejmuje w swojej rozprawie doktorskiej mgr Łukasz Szczukowski.

Dysertacja przedstawiona do recenzji jest oparta o cykl trzech artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie *Bioorganic Chemistry* (jedna praca) oraz *International Journal of Molecular Science* (dwie prace). Łączny współczynnik oddziaływania IF za prace włączone w cykl

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

114 *J. Joralewska*

jest wysoki i wynosi ponad 17, a sumaryczna liczba punktów ministerialnych to 380. Poza wspomnianymi artykułami, Dyplomant umieścił w swojej rozprawie ich streszczenia w języku polskim i angielskim, ułatwiające interpretację oraz rozszerzające treści zawarte w wymienionych publikacjach. W podrozdziale *Wprowadzenie* mgr Łukasz Szczukowski opisał podłoża powstawania procesów zapalnych, sposoby ich leczenia oraz działania niepożądane związane z długotrwałym przyjmowaniem leków stosowanych obecnie w terapii stanów zapalnych. Opisał również metody poszukiwania nowych terapeutyków. W najważniejszej części tego podrozdziału Dyplomant skupił się na sposobie w jaki została odkryta grupa związków którą postanowił rozwijać w swoich badaniach. Mgr Łukasz Szczukowski opisał *Etomorfazon* i inne pochodne pirydazynonu jako związki prototypowe dla przeciwzapalnych pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu odkrytych w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków. W dalszej kolejności przedstawił ogólne założenia na jakich oparł się przy projektowaniu poszczególnych serii pochodnych 1,3,4 oksadiazolowych oraz 1,2,4 triazolowych. W podrozdziale *Cele pracy* Dyplomant wskazał jako cel szczegółowy swoich badań racjonalne projektowanie oraz syntezę nowych pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu o istotnej aktywności przeciwzapalnej i przeciwbólowej. Opisał również cele szczegółowe realizowane przez zespół badawczy, a więc: syntezę związków; określenie ich wpływu na obwodowe formy cyklooksygenazy, aktywności antyoksydacyjnej, modelu wiązania się z albuminą osocza, aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej *in vivo*, oraz opisanie zależności struktura-aktywność (SAR) w obranej grupie związków. W kolejnym podrozdziale *Metodyka badań* Dyplomant opisał metody jakimi posłużył się w celu syntezy zaplanowanych związków. Dalej, następuje *Prezentacja i omówienie wyników badań* zawartych w cyklu publikacji zakończona *Podsumowaniem i wnioskami*. Do dysertacji dołączone zostały również oświadczenia współautorów artykułów oraz piśmiennictwo i wykaz skrótów. Układ pracy oceniam jako przejrzysty i prawidłowy. Dysertacja jest napisana dobrym językiem. Za jedyny mankament formalny uważam brak wyraźnego zaznaczenia, które z prezentowanych wyników nie są zostały opisane w cyklu publikacyjnym, m.in. bardzo wartościowe wyniki badań *in vivo*.

Analizując treść publikacji wchodzących w zakres rozprawy, dotyczy ona najogólniej syntezy nowych pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu oraz ich charakterystykę pod względem przydatności jako związki o działaniu przeciwzapalnym, przez co cały cykl należy uznać za spójny. W publikacji nr 1 [BIOORGANIC CHEMISTRY, 102 (2020), 104035; DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104035] opisana została synteza 14 nowych, 1,3,4-oksadiazolowych pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu oraz szereg ich badań metodami *in vitro* oraz *in silico*. Synteza była prowadzona technikami klasycznymi. Obejmowała przekształcenia chemiczne takie

jak N-, O- alkiłowanie, hydrazynoliza estru, cyklokondensacja hydrazynu i disiarczku węgla prowadząca do wytworzenia pierścienia 1,3,4-oksadiazolo-2-tionu oraz reakcję Mannicha. Bez wątplenia, przedstawiona synteza była pracochłonna a wyniki niektórych etapów nieoczywiste. Analizując ten fragment publikacji nasuwają się pytania dotyczące przebiegu etapu alkiłowania chlorooctanem metylu, tj. dlaczego przy różnicowaniu regioizomerów O/N nie posłużono się technikami 2D-NMR, np. korelacją typu HMBC? Czy próbowano optymalizować warunki reakcji tak, aby selektywnie prowadziły wyłącznie do otrzymania izomerów O- lub N-podstawionych? W dalszych częściach publikacji następuje opis badań *in vitro* i *in silico*: aktywności hamującej cyklooksygenazy COX-1, COX-2; cytotoksyczności względem prawidłowych ludzkich fibroblastów; wpływu na wewnątrzcząsteczkowy poziom wolnych rodników tlenowych i reaktywnych form azotu; wiązania z albuminami; dokowania molekularnego wybranych związków do albuminy i cyklooksygenaz. Wnioski końcowe płynące z tej pracy są bogate, jeden z ważniejszych to wytypowanie inhibicji cyklooksygenaz (szczególnie COX-2) jako mechanizmu potencjalnej aktywności przeciwzapalnej badanej grupy związków.

W publikacji nr 2 [INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2020, 21(24), 9623; DOI: 10.3390/ijms21249623] opisane zostały podobne badania nad grupą 1,3,4-oksadiazolowych pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu do których wprowadzono resztę arylopiperazynową jako dodatkowy farmakofor potencjalnie wzmacniająca działanie przeciwzapalne i przeciwbólne. Przebieg syntezy związków jest ogólnie podobny do opisanego w publikacji nr 1. W kluczowym etapie wykorzystano S-alkiłowanie reszty 1,3,4-oksadiazolo-2-tionu. Mgr Łukasz Szczukowski zauważa, że w tej reakcji otrzymuje się jedynie regioizomery S. Znów nasuwa się pytanie czemu w celu potwierdzenia tego faktu nie posłużył się dwuwymiarowymi technikami spektroskopii NMR. Dodatkowo, Dyplomant w celu oczyszczania związków stosuje krystalizację. Czy istnieje możliwość że N-regioizomer powstaje, jednak pozostaje w roztworze pokryształizacyjnym? Podsumowując wynik badań *in vitro* oraz *in silico* można stwierdzić, że opisana grupa związków m.in. wykazuje wysoką selektywność do COX-2, ma również obiecujące właściwości antyoksydacyjne.

W publikacji nr 3 [INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 2021, 22(20), 11235; DOI: 10.3390/ijms222011235] przedstawiono syntezę i badania *in vitro* oraz *in silico* grupy N-podstawionych 1,2,4-triazolowych pochodnych of pirolo[3,4-*d*]pirydazynonu. Zaprojektowane cząsteczki można rozpatrywać jako analogi strukturalne (izostery) pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych będących przedmiotem publikacji nr 1 i 2. Przeprowadzono liczne eksperymenty określające przydatność tej klasy związków jako potencjalne leki przeciwzapalne.

Rozszerzono wachlarz badań o predykcję właściwości ADME. Podsumowując treść zawartą w tej publikacji, w omawianej grupie pochodnych znaleziono związki o wysokiej aktywności inhibicyjnej wobec COX-2, wiążące się z enzymem w sposób podobny do *Meloksykamu*, o właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych oznaczonych w testach komórkowych. Dodatkowo, związki te spełniają parametry lekopodobności w badaniach *in silico*.

Analizując wkład Dyplomanta w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy przede wszystkim należy zauważyć że jest On pierwszym i korespondującym autorem wszystkich z nich. Dodatkowo, załączone oświadczenia współautorów jasno wskazują wiodącą rolę Dyplomanta w tych pracach. Jego wkład jest określony m.in. jako opracowanie wraz z Promotorem koncepcji badań, zaprojektowanie, otrzymanie i potwierdzenie tożsamości opisywanych związków chemicznych. Co więcej, można wnioskować iż mgr Łukasz Szczukowski uczestniczył w koordynacji zespołu badawczego, zbieraniu wyników, ich interpretacji oraz miał duży udział powstaniu manuskryptów oraz finalnych form publikacji. Zauważalne jest zaangażowanie Dyplomanta w prace multidyscyplinarnego zespołu, co jest pożądaną cechą naukowca zajmującego się Dyscypliną Nauk Farmaceutycznych.

Podsumowując, poziom prac będących przedmiotem rozprawy mgr Łukasza Szczukowskiego jest wysoki i wnoszą one wkład w stan wiedzy na temat poszukiwania nowych leków o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu stanów zapalnych i bólu. Badania opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej są szerokie, mają charakter multidyscyplinarny, z jasno sprecyzowanym wkładem Doktoranta. Należy zwrócić uwagę również na wysokie wskaźniki bibliometryczne publikacji wchodzących w cykl. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Łukasza Szczukowskiego do finalnych etapów przewodu doktorskiego.



ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.tsl.wum.edu.pl

tel.: +48 22 57 20 647
faks: +48 22 57 20 631
tsl@wum.edu.pl

ADIUNKT
Katedra i Zakład Technologii Leków
: Biotechnologii Farmaceutycznej
dr hab. n. farm. Maciej Dawidowski

414 Jmz