

Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 6.05.2022

RN-BF 4000.1.2020
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO
RADY DYSCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis Foralewska 14.06.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Szczukowskiego pt. „*Synteza i aktywność biologiczna nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazyonu*” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Ból towarzyszy człowiekowi od zawsze, zarówno ten fizyczny, jak i psychiczny. Zasadniczo większość uważa, że ból duszy jest trudniejszy do wyleczenia i chyba stąd wynika tak duże zainteresowanie naukowców pracami nad nowymi lekami przeciwdepresyjnymi. Ale czy na pewno mają rację. Chyba każdy z nas wie, co to znaczy ból zęba, ból kręgosłupa czy ból stawów. Sięgamy wtedy po leki o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym. Jeśli ból jest krótkotrwały nie ma problemu, pocujemy ulgę. Ale jeśli ktoś musi leczyć się przez dłuższy czas to my farmaceuci wiemy, jakie konsekwencje niesie za sobą długotrwałe stosowanie leków z grupy NLPZ. Wystarczy spojrzeć na ulotkę dowolnego leku z tej grupy, aby przekonać się, że wskazania do stosowania zawarte są w jednym zdaniu, natomiast przeciwwskazań i działań niepożądanych jest najczęściej strona A4. Pamiętam, jak wprowadzono do leczenia Vioxx, to był przełom w leczeniu bólu. Niestety dość szybko okazało się, że powoduje incydenty kardiotoksyczności włącznie z zejściem śmiertelnym. Los Vioxx-u podzieliło wiele innych substancji. Wciąż trwają prace badawcze nad znalezieniem takiego związku chemicznego, który będzie działał selektywnie, skutecznie a jednocześnie będzie bezpieczny dla pacjenta. Praca badawcza mgr Łukasza Szczukowskiego jest próbą znalezienia alternatywy dla dostępnych leków z grupy NLPZ.

Praca doktorska Pana Łukasza Szczukowskiego została przedstawiona do recenzji w formie cyklu trzech publikacji opublikowanych w latach 2020-2021, w prestiżowych czasopismach o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 17,123$, opatrzonych 44 stronicowym komentarzem w języku polskim oraz takim samym w języku angielskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem oraz

autorem korespondencyjnym. Oświadczenia współautorów wskazują na wiodącą rolę Doktoranta w ich powstaniu.

Komentarz zawiera wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu będącego przedmiotem rozprawy, wprowadzenie, cel pracy, metodykę badań, prezentację i omówienie wyników, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo, oświadczenia współautorów. Doktorant dołączył także prace wchodzące w skład cyklu. Komentarz jest napisany bardzo ładnym językiem, przejrzysto, z czytelnymi wzorami i wykresami, z dużą dbałością o szatę graficzną. W części wprowadzającej Doktorant przedstawia charakterystykę stanu zapalnego a także opisuje cyklooksygenazę, enzym będący celem molekularnym dla aktualnie stosowanych leków przeciwzapalnych, jak też działania niepożądane wynikające ze stosowania inhibitorów COX. Ostatnia część wprowadzenia poświęcona jest pochodnym pirydazynonu. Autor przedstawia przykłady zastosowania tego typu związków, jako inhibitorów COX oraz przywołuje najbardziej obiecujące badania prowadzone w Katedrze Chemii Leków na odkryciem nowych leków w grupie pochodnych pirydazynonu. Na zakończenie wprowadzenia do pracy mgr Szczukowski w formie schematu przedstawił koncepcję budowy nowych związków o potencjalnej selektywnej aktywności w stosunku do COX-2 oraz bezpieczeństwie stosowania i niskiej szkodliwości na błonę śluzową przewodu pokarmowego.

Doktorant postawił sobie jeden główny cel badawczy jakim była synteza nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazynonu o znaczącej aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej.

Cel ten zrealizował poprzez

- otrzymanie serii pochodnych 1,3,4-oksadiazolowych oraz 1,2,4-triazolowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazynonu
- ocenę zdolności hamowania COX-1 i COX-2
- ocenę aktywności antyoksydacyjnej
- określenie modelu wiązania nowo otrzymanych związków z albuminą
- ocenę aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej *in vivo*.

Pierwszy etap pracy syntetycznej polegał na działaniu chlorooctanem metylu w środowisku acetonitrylu na dwa związki : 6-fenilo-3,5,7-trimetylo-2*H*-pirolo[3,4-d]pirydazyno-1,4-dion oraz 6-butylo-3,5,7-trimetylo-6-fenilo-2*H*-pirolo[3,4-d]pirydazyno-1,4-dion. Otrzymano 4 związki: dwie *N*-pochodne oraz dwie *O*-pochodne. Udowodniono, na podstawie widm magnetycznego rezonansu jądrowego, po uprzednim rozdzieleniu na kolumnie, że w warunkach prowadzenia eksperymentu w przewodzie powstawał *O*-izomer. Kolejny krok

polegał na działaniu na otrzymane *O*-analogi wodzianem hydrazyny. Pozwoliło to na otrzymanie hydrazydów, które w reakcji z disiarczkiem węgla ulegały cyklizacji odpowiednio do 6-fenilo-3,5,7-trimetylo-1-[(2-tio-3H-1,3,4-oksadiazol-5-yl)metoksy]pirolo[3,4-d]pirydazyno-4-onu oraz 6-butylo-3,5,7-trimetylo-1-[(2-tio-3H-1,3,4-oksadiazol-5-yl)metoksy]pirolo[3,4-d]pirydazyno-4-onu. Ostatni etap syntezy polegał na reakcji otrzymanych związków z siedmioma aminami drugorzędowymi i 37% wodnym roztworem formaldehydu. Większość amin stanowiły pochodne fenylpiperazyny z podstawnikami elektronoakceptorowymi i jednym elektronodonorowym. W ten sposób Doktorant otrzymał 14 nowych związków o charakterze zasad Mannicha. Następnie Doktorant postanowił sprawdzić czy długość linkera pomiędzy wyjściowym układem heterocyklicznym a aminą może mieć wpływ na aktywność. Wobec tego otrzymał cztery pochodne, w których ugrupowanie arylopiperazynowe połączone jest z atomem siarki pierścienia oksadiazolotionu przez łącznik 2-oksoetylowy. Zasadniczo, ciężko moim zdaniem porównywać aktywność związków gdzie siarka jest wolna a podstawienie nastąpiło przy atomie azotu z aktywnością pochodnych z podstawionym atomem siarki. Może lepiej było przeprowadzić reakcję z difluorowcoalkanem i poddać tak otrzymane *N*-halogenoalkilowe pochodne działaniu amin.

Kolejne prace syntetyczne miały na celu otrzymanie szeregu nowych związków, gdzie w miejsce oksadiazolu został wprowadzony układ 1,2,4-triazolu. Jako substrat Doktorant zastosował hydrazyd kwasu 2-(6-butylo-3,5,7-trimetylo-4-okso-pirolo[3,4-d]pirydazyn-1-yl)oksooctowego. W tym miejscu nasuwa się pytanie: dlaczego wybór padł na związek z podstawnikiem alifatycznym a nie z pierścieniem fenylowym? W reakcji z trzema izotiocyanianami: metylu, fenylu oraz 4-metoksyfenylu otrzymał odpowiednie pochodne tiosemikarbazynu, które poddał cyklizacji w środowisku zasadowym do analogów cyklicznych, pochodnych 1,2,4-triazolu. Otrzymane w ten sposób związki stały się substratami do reakcji tworzenia zasad Mannicha oraz *S*-pochodnych. W tym przypadku Doktorant zastosował trzy pochodne fenylpiperazyny. Niektóre z zastosowanych w syntezach amin Autor otrzymał również na drodze syntezy. W wyniku przeprowadzonych reakcji z zastosowaniem hydrazydu kwasu 2-(6-butylo-3,5,7-trimetylo-4-okso-pirolo[3,4-d]pirydazyn-1-yl)oksooctowego mgr Szczukowski otrzymał 24 związki nieopisane dotychczas w literaturze. Podsumowując tę część pracy pragnę zwrócić uwagę na otrzymanie szeregu nowych związków, z dobrą wydajnością, o zadowalającej czystości i prawidłowo

potwierdzonej strukturze. Świadczy to o dobrym przygotowaniu Doktoranta do prowadzenia badań syntetycznych oraz opanowaniu zarówno metod syntezy, jak i analizy strukturalnej. Nasuwa się tutaj również spostrzeżenie, że badania rozpoczęte w ramach tej pracy można kontynuować, stosując chociażby wszystkie aminy opisane w publikacji 1 do syntezy pochodnych triazolowych.

Kolejne etapy pracy obejmujące badania biologiczne, strukturalne oraz *in silico* zostały wykonane we współpracy z innymi Zakładami Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu: Katedrą i Zakładem Farmakologii, Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej.

Jako pierwsze wykonano testy cytotoksyczności celem wykluczenia z dalszych badań związków toksycznych. Do badań wykorzystano linię komórkową fibroblastów skóry ludzkiej. W grupie związków z układem oksadiazolu wszystkie okazały się być nietoksyczne wobec tego zostały zakwalifikowane do dalszych badań. Pięć związków z układem triazolu charakteryzowała się znaczną cytotoksycznością wobec tego do dalszych badań przekazano tylko 13 z nich. Kolejny etap badań biologicznych obejmował wyznaczenie zdolności hamowania cyklooksygenazy. Jako leku referencyjnego w badaniach obu grup związków użyto meloksykam – stosowany w leczeniu preferencyjny inhibitor COX-2. Wszystkie analizowane pochodne 6-fenyl-3,5,7-trimetylo-1-[(2-tio-3H-1,3,4-oksadiazol-5-yl)metoksy]pirolo[3,4-d]pirydazyno-4-onu oraz 6-butylo-3,5,7-trimetylo-1-[(2-tio-3H-1,3,4-oksadiazol-5-yl)metoksy]pirolo[3,4-d]pirydazyno-4-onu skuteczniej hamowały COX-2 niż lek referencyjny. Współczynnik selektywności COX-2/COX-1 obliczony dla każdego z analizowanych związków również był lepszy niż dla meloksykamu. Spośród drugiej grupy związków poddanej testom enzymatycznym cztery blokowały preferencyjnie COX-2, kolejne cztery okazały się selektywne w stosunku do tej izoformy enzymu. Tutaj również osiem związków działało lepiej niż meloksykam, jednak słabiej niż celekoksyb zastosowany, jako drugi lek referencyjny w badaniach.

Dla potwierdzenia wyników badań enzymatycznych wykonano badania dokowania molekularnego. W przypadku związków z układem oksadiazolu udało się potwierdzić ich większe powinowactwo do COX-2 niż COX-1. Natomiast w przypadku pochodnych z układem triazolu wyniki badań *in vitro* nie korelują już tak dobrze z wynikami *in silico*. Jest to bardzo cenne spostrzeżenie, które w przyszłości pozwoli racjonalnie projektować nowe związki do syntezy. Kolejny etap badań biologicznych dotyczył oceny potencjału antyoksydacyjnego nowych związków. Przeprowadzono eksperymenty, które pozwoliły określić zdolność

badanych związków do hamowania indukowanego stresu antyoksydacyjnego oraz nitrozacyjnego. Niektóre z otrzymanych pochodnych działają antyoksydacyjnie. Ma to duże znaczenie w przypadku poszukiwania związków o aktywności przeciwzapalnej z uwagi na fakt, iż wolne rodniki są silnymi czynnikami prozapalnymi. Na podstawie wyników badań enzymatycznych wytypowano dwie pochodne do badań *in vivo*. Obie były pochodnymi 6-butylo-3,5,7-trimetylo-1-[(2-tio-3H-1,3,4-oksadiazol-5-yl)metoksy]pirolo[3,4-d]pirydazyno-4-onu: jedna o najlepszym współczynniku hamowania COX-2/COX-1 oraz druga o selektywnym działaniu w stosunku do COX-2. Przeprowadzone eksperymenty miały na celu ocenę aktywności przeciwbólowej oraz przeciwzapalnej, wpływu badanych substancji na błonę śluzową żołądka oraz ekspresję mediatorów stanu zapalnego. Na podstawie wyników badań można stwierdzić, że badane związki charakteryzowały się porównywalną do indometacyny siłą działania przeciwbólowego. Mechanizm działania nowych pochodnych jest związany z hamowaniem cyklooksygenazy, co zostało potwierdzone nie tylko w badaniach enzymatycznych ale również w analizie stężenia mediatorów stanu zapalnego. Ponadto, obserwacje błony śluzowej żołądka zwierząt laboratoryjnych pozwoliły na stwierdzenie, że badane związki są bezpieczne, zarówno w analizie makro- jak i mikroskopowej nie zaobserwowano wpływu na śluzówkę.

Dodatkowo przeprowadzono także badania zdolności wiązania nowo otrzymanych pochodnych z albuminą. Jest to istotna informacja z punktu widzenia możliwości dystrybucji związku po podaniu oraz czasu działania. Na podstawie wyników pomiarów CD oraz FTIR stwierdzono, że w obecności badanych związków zachodzą zmiany w strukturze BSA, co świadczy o interakcji białka z ligandem. Analiza wyników uzyskanych ze spektroskopii fluorescencyjnej wskazała na tworzenie kompleksów nowych pochodnych z BSA w stosunku 1:1.

Podsumowując, Doktorant w wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymał 48 dotychczas nieopisanych w literaturze związków. Strukturę wszystkich pochodnych jednoznacznie potwierdził metodami spektralnymi. Nowo otrzymane związki zostały poddane badaniom biologicznym w kierunku aktywności przeciwbólowej oraz przeciwzapalnej. Metodologia tych badań nie budzi wątpliwości. Przeprowadzone badania biologiczne są kompletnym panelem pozwalającym na wyciągnięcie miarodajnych wniosków, co w przyszłości może przyczynić się do racjonalnego projektowania kolejnych pochodnych w prezentowanej grupie związków.

Analizując poszczególne etapy stwierdzam, że założone cele zostały zrealizowane. Doktorant wykazał się wiedzą, pracowitością, opanowaniem technik syntetycznych. Badania zostały zaplanowane w sposób logiczny, a jednocześnie wciąż pozostają otwarte, z możliwością kontynuacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań Pan mgr Szczukowski udowodnił, że 1,3,4-oksadiazolowe pochodne pirolo[3,4-d]pirydazynonu są obiecującą grupą syntetyków o dobrej aktywności przeciwbólowej, przeciwzapalnej, pozbawionych działania gastrotoksycznego, które mogą w przyszłości stanowić alternatywę dla dostępnych leków z grupy NLPZ.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam ją za interesującą, nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ze względu na te walory, oraz fakt opublikowania wyników badań w prestiżowych czasopismach branżowych o wysokim współczynniku oddziaływania IF pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Łukasza Szczukowskiego do wyróżnienia.

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UM we Wrocławiu wniosek o nadanie mgr Łukaszowi Szczukowskiemu stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sutyr' or similar, located in the lower right quadrant of the page.