

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

Lublin, 09.01.2020

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Góry pt. „Synteza i badania chemiczno-farmakologiczne nowych pochodnych 1,3-dipodstawionego piroolidyno-2,5-dionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej”, wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Padaczka wciąż jest jedną z najczęściej występujących chorób neurologicznych. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia na padaczkę choruje około 1% 20-latków i 3% 75-latków a około 10% osób doznaje co najmniej jednego napadu drgawkowego w życiu. Zgodnie z danymi Epilepsy Foundation of America, na padaczkę cierpi około 3 miliony Amerykanów, na świecie natomiast około 40 milionów ludzi. W Polsce choruje ponad 400 tysięcy osób. Rokrocznie na świecie rejestruje się około 200 000 nowych zachorowań.

Obecnie w leczeniu padaczki stosuje się około 30 leków, o zróżnicowanej strukturze chemicznej i różnorodnych mechanizmach działania. To dość pokaźna liczba, jak na jedną jednostkę chorobową a jednak szacuje się, że leki przeciwpadaczkowe dają zadowalające efekty jedynie u 50% pacjentów. Stąd też ciągła potrzeba poszukiwania nowych, skutecznych leków. Badania nad poszukiwaniem nowych leków prowadzone są na drodze modyfikacji struktur już istniejących leków, syntezy nowych związków w oparciu o model farmakoforowy oraz projektowanie oparte na strukturze celu biologicznego.

Pani profesor Jolanta Obniska jest znanym badaczem, zajmującym się syntezą nowych związków o aktywności przeciwdrgawkowej w grupie pochodnych piroolidyno-2,5-dionu. Ma na tym polu liczne sukcesy. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani Małgorzaty Góry jest kontynuacją badań prowadzonych przez zespół pod kierownictwem Pani Profesor.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z klasycznym podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cel badań, opis badań, podsumowanie i wnioski, część doświadczalna, piśmiennictwo. Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Góry liczy 112 stron tekstu, w których zawarte są 33 ryciny i 16 tabel. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Praca napisana jest bardzo dobrze pod względem stylistycznym i językowym. Piśmiennictwo zebrane w kolejności cytowania liczy 128 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane. Pracę poprzedza streszczenie w języku polskim i angielski. Na końcu rozprawy Doktorantka umieściła wykaz publikacji, których jest współautorem.

Wstęp pracy jest poświęcony lekom przeciwpadaczkowym. Pani Małgorzata Góra przedstawia charakterystykę zarówno stosowanych leków przeciwpadaczkowych, jak i kandydatów na leki, będących w II i III fazie badań klinicznych. Zwraca uwagę opis poszczególnych elementów struktury cząsteczek oraz proponowanych mechanizmów działania. Rozdział ten świadczy o znajomości aktualnego piśmiennictwa, wiedzy z zakresu chemii leków i farmakologii oraz dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjętych badań.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Góry było otrzymanie nowych, pochodnych pirolidyno-2,5-dionu, zbadanie ich aktywności przeciwdrgawkowej oraz przeciwbólowej oraz określenie prawdopodobnego mechanizmu działania *in vitro*.

Doktorantka na drodze kilkuetapowej syntezy otrzymała 51 nowych pochodnych kwasu pirolidyno-2,5-dioksyoctowego, w których przy węglu C-3 pirolidynonu wprowadzono podstawnik benzhydrylowy, but-2-ylowy, 2- i 3-chlorofenyłowy, 3-metylotiof-2-enowy, natomiast amidowy atom azotu połączono z pochodnymi 4-arylopiiperazyny. Ponadto mgr Góra zsyntetyzowała związki, posiadające podstawnik metyloctofenowy oraz benzo[b]tiofenowy w położeniu 3 układu pirolidynonu oraz morfolinę połączoną linkerem 2- i 3-węglowym z azotem imidowym oraz serię pochodnych 3-(benzo[b]tiofen-2-yl)-1-arylopiiperazynopropylo-pirolidyno-2,5-dionu.

Budowę chemiczną wszystkich nowo zsyntetyzowanych związków Doktorantka potwierdziła w oparciu o widma ^1H NMR, ^{13}C NMR oraz analizę LC/MS.

W pierwszym etapie Doktorantka otrzymała odpowiednie kwasy bursztynowe: 2-benzhydrylobursztynowy, 2-*sec*-butylobursztynowy, 2-(2-chlorofenylo)bursztynowy oraz 2-(3-chlorofenylo)bursztynowy. Następnie, otrzymane kwasy w reakcji cyklokondensacji z kwasem aminoctowym przekształcono w odpowiednie 3-podstawione kwasy pirolidyno-2,5-dioksyoctowe. Kolejnym etapem była reakcja pomiędzy pochodnymi kwasu octowego a

arylopiperazynami, prowadzona w środowisku *N,N*-dimetyloformamidu, w obecności *N,N*-karbonylodiimidazolu. W ten sposób Doktorantka otrzymała cztery serie pochodnych acetamidowych (serie I – IV). Kolejną serię związków pochodnych 1-podstawionych 3-(3-metylotiofen-2-ylo)pirolidyno-2,5-dionu (seria V) Autorka otrzymała również w reakcji wieloetapowej, wychodząc z 3-metylo-tiofeno-2-karboaldehydu. Ponadto, Doktorantka otrzymała związki zawierające morfolinę oraz fenylopiperazynę połączone różnej długości łańcuchem alkilowym z azotem imidowym pirolidyno-2,5-dionu (serie VI i VII) w reakcji cyklokondensacji kwasu 2-(3-metylo-tiofen-2-ylo)bursztynowego oraz 2-(benzo[*b*]tiofen-2-ylo)bursztynowego z 2-morfolino-etano-1-aminą, morfolinopropano-1-aminą oraz z otrzymanymi wcześniej podstawionymi 3-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)propano-1-aminami. Opis tego etapu pracy jest wyczerpujący, świadczy o dużej pracowitości Doktorantki. Struktury wszystkich finalnych związków nie budzą wątpliwości. Analiza widm jest opisana w sposób bardzo rzetelny.

Wszystkie otrzymane związki zostały przekazane do badań farmakologicznych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej. Badania wykonano w Katedrze Farmakodynamiki UJ CM. W ramach *screeningu* wykonano badania *in vivo* na myszach, które obejmowały trzy podstawowe testy: test maksymalnego wstrząsu elektrycznego, test drgawek kardiazolowych oraz test obracającego się pręta. Uzyskane wyniki badań farmakologicznych wykazały, że 16 spośród otrzymanych związków charakteryzowało się aktywnością przeciwdrgawkową, głównie w teście drgawek wywołanych prądem elektrycznym 6 Hz, część także w teście MES. W kolejnym etapie pracy dla tychże związków wyznaczono dawkę efektywną (ED_{50}), dawkę toksyczną (TD_{50}) oraz indeks ochronny (PI). W oparciu o wyniki badań stwierdzono, że najbardziej aktywne spośród wszystkich badanych związków okazały się pochodne zawierające w położeniu 3 układu pirolidyno-2,5-dionu 3-metylotiofen lub benzotiofen, łącznik 3-węglowy oraz morfolinę.

Z uwagi na zastosowanie niektórych leków przeciwpadaczkowych w leczeniu bólu, postanowiono wybrane związki przekazać do badań w kierunku aktywności przeciwbólowej. W badaniach wykorzystano 3 zwierzęce modele bólu: test gorącej płytki, jako model bólu ostrego, test formalinowy, będący modelem bólu tonicznego oraz test przeciągania, służący do wykrywania obwodowej aktywności przeciwbólowej. Spośród siedmiu badanych związków dwa charakteryzowały się obiecującą aktywnością przeciwbólową 3-benzhydrylo-1-{2-[4-(3-trifluorometylofenylo)piperazyn-1-ylo]-2-oksoetylo}pirolidyno-2,5-dion oraz chlorowodorek 1-{3-[4-(3,4-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]propylo-3-(3-metylotiofen-2-

ylol)pirolidyno-2,5-dionu. Analizując ten rozdział pracy nasuwa się pytanie dlaczego Doktorantka nie przekazała do badań wszystkich związków najbardziej aktywnych w badaniach aktywności przeciwdrgawkowej?

Kolejny etap pracy obejmował badania mające na celu stwierdzenie prawdopodobnego mechanizmu działania przeciwdrgawkowego otrzymanych połączeń. W tym celu, dla wybranych aktywnych związków wykonane zostały badania radioreceptorowe w kierunku powinowactwa do napięciowo-zależnych kanałów sodowych i wapniowych, receptorów GABA_A i TRPV1, a także do transportera GABA (GAT). Uzyskane wyniki badań *in vitro* wykazały, że część badanych związków charakteryzuje się wysokim powinowactwem do kanałów sodowych, jednak najbardziej aktywne pochodne w testach na zwierzętach nie wykazały powinowactwa ani do kanałów sodowych i wapniowych ani do badanych receptorów. Wobec tego prawdopodobny mechanizm działania przeciwdrgawkowego tego typu połączeń pozostaje wciąż niewyjaśniony.

Biotransformacja większości leków zachodzi w wątrobie. Jest ściśle związana ze szlakami utleniania docierających do ustroju związków, głównie z wykorzystaniem układu cytochromu P450. Częstość występowania działań niepożądanych leków w odniesieniu do wątroby obserwuje się w 1 przypadku na 100000 pacjentów, jednak praktycznie 50% przypadków ostrej niewydolności wątroby jest spowodowane stosowaniem leków. Stąd tak ważne są badania hepatotoksyczności kandydatów na leki. 12 z otrzymanych związków przekazano do badań *in vitro* na liniach komórkowych HepG2. Uzyskane wyniki wskazują, iż wszystkie związki nie indukują hepatotoksyczności w zakresie stężeń 1-50 μM. W tym miejscu można było pokusić się o porównanie otrzymanych wyników z wielkościami dawek efektywnych w badaniach aktywności przeciwdrgawkowej. Zdecydowanie ułatwiłoby to interpretację otrzymanych wyników.

Kolejny rozdział przedstawionej do oceny pracy doktorskiej dotyczy oceny właściwości fizykochemicznych w oparciu o reguły Lipińskiego i Vebera przy pomocy algorytmów obliczeniowych na stronie SwissAdme. Co prawda przewidywanie nie zawsze pokrywa się z danymi otrzymanymi eksperymentalnie, ale przy dużej liczbie związków jest możliwość wykluczenia pewnych struktur z dalszych badań czy też wyciągnięcia wniosków co do kierunku dalszych modyfikacji. Doktorantka stwierdziła, iż na siedemnaście aktywnych związków czternaście okazało się zgodnych z kryteriami Lipińskiego.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej to opis zależności pomiędzy strukturą zsyntetyzowanych związków a ich aktywnością biologiczną. Rozdział ten świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki i umiejętności wyciągania adekwatnych wniosków.

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Góry pt. „Synteza i badania chemiczno-farmakologiczne nowych pochodnych 1,3-dipodstawionego pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Autorkę.

W pracy znalazły się pewne drobne błędy redakcyjne na stronach: 13, 26, 30, 32, 33 (dwa), 76, 82, 83, 100, 106, 107.

Ponadto,

str. 35 nazwa kwasu pirolidyno-2,5-diono-octowego jest nieprawidłowa powinno być kwas 2,5-diokso-pirolidyno-octowy, ten błąd pojawia się kilkakrotnie w tekście rozprawy.

str. 39 Doktorantka nazwała kwasy bursztynowe, określając położenie podstawników jako pozycję 3 podczas gdy znajdują się one w pozycji 2.

str. 40 w języku polskim w nazwach związków dodaje się samogłoskę „o” pomiędzy dwoma członami nazwy jeśli jedna kończy się spółgłoską a druga zaczyna, 3-metylotiofen-2-karboaldehyd jest nazwą angielską, w języku polskim powinno być 3-metylotiofeno-2-karboaldehyd. Podobnie powinno być benzo[b]tiofeno-2-karboaldehyd.

str. 51 sformułowanie...atom fluoru w położeniu-4 1-fenylopiiperazyny w moim odczuciu jest nieprecyzyjne, lepiej użyć określenia ze strony 54....atom.... w położeniu-3 pierścienia aromatycznego 1-fenylopiiperazyny. Podobnie na str. 49

str. 77, 79 w nazwie 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu powinno być 1,3-dipodstawionego

str. 83 nazwy niektórych związków serii VI i VII w tytule podrozdziału są niepoprawne.

str. 93 nazwa amidy kwasu 3-(3-chlorofenylo)-pirolidyno-2,5-diono-octowego powinna brzmieć amidy kwasu 3-(3-chlorofenylo)- 2,5-diokso-pirolidyno-octowego

W piśmiennictwie powinno się, moim zdaniem, podawać wszystkich współautorów.

Wymienione przez mnie uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Góry.

Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za bardzo interesującą, nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ze względu na te walory, a także z uwagi na znaczący dorobek publikacyjny Doktorantki, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Małgorzaty Góry do wyróżnienia.

Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o nadanie mgr Małgorzacie Górze stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej

Prof. dr hab. Monika Wujec