



**Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków
Lecznicych z Pracownia Modelowania Komputerowego**

*Wydział Farmaceutyczny, Kolegium Nauk Farmaceutycznych
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-488 70 72*



**Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology
of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab**

*Faculty of Pharmacy, Collegium of Pharmaceutical Sciences
Medical University of Lublin
4A Chodźki str., 20-093 Lublin, Poland
Phone/fax *048-81-488 70 72*

Lublin, 10-06-2021

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr inż. Katarzyny HAŁDYS

**z Katedry Chemii Bioorganicznej
Wydziału Chemicznego
Politechniki Wrocławskiej we Wrocławiu**

pt. „Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase”.

Moje doświadczenia związane z recenzowaniem doktoratów obejmujących związki aktywne biologicznie pozwala mi na pewne uogólnienia zmian, które się dokonały w ostatnim czasie w doktoratach. Zmiany, które obserwuję są jakościowe i ilościowe. Jakość to pełniejsze wykorzystanie wiedzy o możliwych przyczynach chorób, to wybór właściwych celi molekularnych. Ilość to różnorodność badań, które są wykonywane aby nie tylko udowodnić aktywność ale także potwierdzić skuteczność, czyli np. brak działań ubocznych. Zwiększa to wymagania w stosunku do doktorantów, zarówno w obszarze „Wiedza” jak i „Umiejętności”. Bez tego nie można prawidłowo zaplanować, wykonać i zanalizować wyniki żadnego projektu. Nie jest to proste ponieważ wymagania obejmują różne dziedziny – synteza, badania funkcjonalne, badania behawioralne, bioinformatyka. Sporo tego. Na szczęście możemy korzystać z dobrych przykładów – krajowych i zagranicznych. Odpowiednia aparatura to także nie problem. Stąd prace są coraz lepsze, coraz obszerniejsze (na

szczęście nie objętościowo, bo to zhora recenzentów) i uwiecznione odkryciem struktur wiodących i dobrych kandydatów na leki.

Praca P. mgr inż. Hałdys przedstawiona do recenzji została skonstruowana według tego schematu, łącząc elementy syntetyczne, informatyczne i biologiczne. Mieści się również w szerokim programie badawczym prowadzonym w grupie prof. Rafała Latajki w Katedrze Chemii Bioorganicznej Politechniki Wrocławskiej. Program ten dotyczy poszukiwania nowych ligandów tyrozynazy. Potencjalne zastosowanie inhibitorów tyrozynazy jako substancji wybielających dodaje do pracy bardzo wyraźny aspekt praktyczny, wdrożeniowy. Wskazuje to na wyraźne przesuwanie się środka ciężkości takich projektów z badań podstawowych na badania rozwojowe.

Celem pracy mgr inż. Hałdys była synteza oraz ocena aktywności pochodnych tiosemikarbazydu modyfikowanych strukturalnie w pozycji 1 oraz 4. W pozycji 1 umieszczany był podstawnik aromatyczny (R1) oraz wodór lub grupa metylowa (R2) a w pozycji 4 podstawnik alkilowy lub aryloalkilowy. Tak zaplanowana synteza pozwoliła na właściwe, przestrzenne scharakteryzowanie domeny aktywnej enzymu, zarówno po względem sterycznym i elektronowym oraz oddziaływań polarnych i niepolarnych. Zakres badań biologicznych objął ocenę aktywności w stosunku do enzymu oraz wpływ na aktywność sumaryczną w procesie melanogenezy. Co ciekawe znaczna część badanych pochodnych wykazywała silniejszy wpływ na proces melanogenezy niż by to wynikało z powinowactwa do enzymu. Sugeruje to wielokierunkowy mechanizm działania. Szkoda, że ten aspekt nie został gruntowniej przebadany, tym bardziej, że brak jest szerokich opracowań obejmujących także inne cele molekularne.

Struktura podstawowa – tiosemikarbazyd, w badaniach mgr Hałdys pojawiła się w wyniku analizy literatury źródłowej oraz badań wyprzedzających w zespole promotora. Inhibująca tyrozynazę aktywność pochodnych tiomocznika oraz innych pochodnych zawierających azot i siarkę, także w układach heterocyklicznych oraz prace nad tiosemikarbazonami aldehydów aromatycznych i heterocyklicznych umożliwiły doktorantce wybór struktur do badań. Część pochodnych została wcześniej otrzymana i poddana badaniom funkcjonalnym (kinetycznym – dr E. Wolińska, doktorat 2019) oraz modelowaniu komputerowemu (dr M. Jewgiński). W sumie badaniom poddano 53 pochodne oraz tiosemikarbazon benzaldehydu i kwas koji jako substancje referencyjne.

W zakresie badań biologicznych doktorantka wyizolowała i oczyściła tyrozynazę (z pieczarek), określiła aktywność enzymu oraz zbadała wpływ otrzymanych

pochodnych na aktywność enzymu. Nie wszystkie związki okazały się aktywne w stosunku do enzymu ale te aktywne posiadały wartość IC_{50} na poziomie 0.3-300 μM . Około 30 z badanych związków wykazało aktywność znacznie wyższą niż kwas koji a 16 wyższą niż tiosemikarbazon benzaldehydu. Badania nad tak obszerną grupą pozwoliły na opracowanie szczegółowej analizy zależności struktury i aktywności (SAR). Doktorantka zbadała również mechanizm oddziaływania ligand-białko oraz jego kinetykę. Siedem z otrzymanych pochodnych wykazywało aktywność w dawkach poniżej 1 μM co stawia je w gronie dobrych struktur wiodących. Ich duże powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu doktorantka potwierdziła również modelowaniem molekularnym, w którym związki najbardziej aktywne chelatują jony miedzi z atomem siarki umieszczonym pomiędzy tymi jonami. Modelowanie i doking doktorantka wykonała programem GOLD, który opiera się na strukturach krystalicznych a więc dokuje metodą „sztywny-do-sztywnego”, przez co nie uwzględnia elastyczności ani białka ani ligandu. Interesujące byłoby sprawdzenie wyników dokowania także innymi programami dokującymi. Prócz badania aktywności w stosunku do enzymu doktorantka przebadła również wpływ badanych pochodnych na melanogenezę oraz proliferację komórek (toksyczność komórkowa). Wyniki wskazują, że pochodne tiosemikarbazony mają szersze działanie, nie ograniczające się jedynie do tyrozynazy. Niestety w pracy brakuje sugestii na temat innych celi molekularnych ani możliwych modyfikacji strukturalnych w celu zwiększenia selektywności w stosunku do tyrozynazy.

Praca napisana jest zwięźle, jasno i klarownie. Wnioski są uzasadnione i dobrze umotywowane. Planowanie, realizacja badań, opis a przede wszystkim dyskusja świadczą o znakomitym przygotowaniu doktorantki do pracy naukowej. Należy podkreślić, że cała praca napisana jest po angielsku dobrym i zrozumiałym językiem z kilkoma małymi literówkami, które nie mają wpływu na ogólną jakość prezentacji.

W związku z funkcją recenzenta chciałbym zwrócić doktorantce uwagę na pewne zagadnienia, które wymagałyby wyjaśnienia. W części literaturowej w cytowanych źródłach brak jest tytułów, które niejednokrotnie pomagają w szybkiej analizie tematyki artykułu. Określenia „oddziaływania alkilowe” (str. 97) są trochę zbyt ogólne ponieważ oddziaływania takich niepolarnych grup mogą wchodzić w zakres albo oddziaływań hydrofobowych albo van der Waals’a. Mam także wątpliwości co do stwierdzenia ze strony 90, że najaktywniejsze pochodne podstawione w pozycji *para* „nie wykazują żadnych interakcji z resztami aminokwasowymi enzymu”. W figurze 27

w opisie pojawia się dwukrotnie element (c). Uważam również, że wykresy dla BATSC i KA powinny pojawiać się na każdym wykresie a nie tylko na wykresie (a) w figurze 20 (str. 70, 71). Ułatwiłoby to znacznie porównywanie aktywności w tak licznej grupie pochodnych. Na stronie 71 doktorantka umieściła stwierdzenie, że wszystkie badane tiosemikarbazony wykazały zależną od stężenia aktywność podczas gdy związki 5, 9, 25 i 27 takiej aktywności nie wykazywały. Należy także ujednoczyć zakresy stężeń w części ogólnej (str. 64) oraz w części eksperymentalnej, oraz na stronie 53 podać, czy gradient jest na czas czy objętości.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny HAŁDYS jest pozytywna ponieważ postawione cele badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorantka wykazała się znakomitą opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań oraz oceny ich wyników. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Składam zatem wniosek do Wysokiego Kolegium Nauk Chemicznych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny HAŁDYS do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Środków Chemicznych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny