



# UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

## WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Zakład Chemii Leków

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel. (85) 748-57-06, FAX (85) 748-58-66

[pal@umb.edu.pl](mailto:pal@umb.edu.pl)

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka

Białystok, 22.07.2013.

### OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

**PT.: "Zastosowanie dendrymerów w technologii wytwarzania pochodnych kwasu iminodioctowego jako substancji diagnostycznych w tomografii magnetycznego rezonansu jądrowego" wykonanej przez mgr Magdalenę Markowicz-Piasecką w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi kontynuację badań zespołu naukowego Zakładu Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków UM w Łodzi nad doskonaleniem farmaceutyków do celów diagnostycznych i terapeutycznych. Rozprawa doktorska koncentruje się na ocenie możliwości zastosowania dendrymerów jako nośników kompleksów gadolinu z pochodnymi kwasu imino-dioctowego, stanowiących potencjalne środki kontrastowe. Zagadnienie to jest szczególnie ważne ze względu na zapotrzebowanie na nieinwazyjne metody diagnostyki obrazowej tkanek i narządów, między innymi techniką magnetycznego rezonansu jądrowego. Poszukiwanie substancji kontrastowych o optymalnych właściwościach kontrastujących i farmakokinetycznych stanowi przedmiot zainteresowań badawczych Doktorantki.

Wieloletnie doświadczenia badawcze zespołu naukowego Zakładu Chemii Farmaceutycznej i Analizy Leków pozwoliły określić ogólne wymagania strukturalne środka kontrastującego do celów diagnostyki narządów metodą rezonansu magnetycznego. Okazały się nimi kompleksy pierwiastków ziem rzadkich, np. Gadolin z pochodnymi kwasu iminodioctowego. Skracają one czas relaksacji T1 i T2 protonów w polu magnetycznym, zjawiska wymaganego do kontrastowego obrazowania tkanek. W celu polepszenia właściwości kontrastowych tych związków Doktorantka postanowiła skoniugować te związki z dendrymerami o różnej masie cząsteczkowej. Wiadomo bowiem, że wielkocząsteczkowe związki kontrastujące wykazują lepsze właściwości kontrastowe poprzez skrócenie czasu relaksacji.

Z tego względu Autorka rozprawy doktorskiej przeprowadziła syntezę pochodnych kwasu imino-dioctowego poprzez koniugację tego kwasu z pochodnymi acetanilidu.

Acetanilid został modyfikowany obecnością 1, 2 lub 3 reszt metylowych w reszcie fenylovej oraz atomem bromu w tri-metylovej pochodnej acetanilidu. Syntezę otrzymanych związków przeprowadzono klasyczną metodologią chemii organicznej. Strukturę otrzymanych związków Doktorantka potwierdziła analizą elementarną oraz analizą widma  $^1\text{H}$  NMR oraz IR. Otrzymane związki przeprowadzono w sole litowe potwierdzając ich strukturę analizą elementarną i analizą widma IR, a następnie skompleksowano je z Gadolinem ( $\text{Gd}^{3+}$ ) tworząc sól sodową. Związki te (4 produkty syntezy) po dokładnej analizie i potwierdzeniu tożsamości (analiza elementarna, IR) zostały poddane koniugacji z dendrymerami G1-G4 PAMAM w celu oceny wpływu tych dendrymerów na ich rozpuszczalność oraz identyfikację sposobu interakcji pomiędzy tymi związkami. W celu oceny wpływu dendrymerów na rozpuszczalność badanych ligandów Doktorantka zastosował spektrofotometryczną metodę rozpuszczalności równowagowej. Pozwoliła ona wykazać korzystny wpływ dendrymerów na rozpuszczalność pochodnych kwasu imino-dioctowego, zależny od stężenia i masy cząsteczkowej dendrymeru, a także stabilność otrzymanych kompleksów. Natomiast analiza widma  $^1\text{H}$  NMR oraz 2D-NOESY wykazała elektrostatyczną interakcję pomiędzy grupami aminowymi dendrymeru a karboksylowymi pochodnych kwasu imino-dioctowego. Do dalszych badań Doktorantka zastosowała dendrymery G3 i G4 w celu utworzenia kompleksów z gadolinowymi pochodnymi kwasu imino-dioctowego. Metodą analizy spektrofotometrycznej Doktorantka wykazała zdolność wiązania przez jedną cząsteczkę dendrymeru PAMAM G4 aż 68 cząsteczek kompleksów gadolinu z badanymi pochodnymi kwasu imino-dioctowego.

W toku dalszych badań Doktorantka oceniła toksyczność powyższych środków kontrastowych poprzez ocenę ich wpływu na komórki śródbłonna naczyniowego, a także na krzepliwość krwi i fibrylizację w testach *in vitro*. Wszystkie badane dendrymery (PAMAM G3 i G4) okazały się toksyczne w teście oceny impedancji komórek śródbłonkowych. Wykazywały również niekorzystny wpływ na krzepliwość krwi i proces fibrylizacji, podobnie jak pochodne kwasu imino-dioctowego. W obydwu przypadkach (cytotoksyczność i wpływ na krzepliwość) zagadnienie działań niepożądanych wymaga szerszej dyskusji w kontekście przewidywanych stężeń badanych związków (prawdopodobnie milimolowych) w osoczu i tkankach w następstwie skutecznego ich zastosowania jako środków kontrastowych. Jednakże gadolinowe kompleksy dendrymerów w stężeniu 10 mikromolowym nie wykazały wpływu na badany układ hemostazy, sugerując ich bezpieczeństwo. Rodzi się pytanie o trwałość badanych kompleksów, ewentualnie toksyczność produktów degradacji, sposób i czas ich eliminacji itp. Ponadto rozważania nad bezpieczeństwem badanej grupy związków wymagają

innych modeli badawczych niż model komórkowy *in vitro*, wrażliwy na zmiany osmotyczności pod wpływem dendrymerów. Wnioski dotyczące ich wpływu na hemostazę również powinny być ostrożniejsze z uwagi na ocenę jedynie części systemu krzepnięcia krwi z pominięciem ważnego działania w tym procesie płytek krwi. Zagadnienia te nie podważają uzyskanych wyników badań, stanowią jedynie wstęp do dyskusji nad skutecznością i bezpieczeństwem badanej grupy środków diagnostycznych.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia poznawczego. Doktorantka wykorzystwała doświadczenie innych badaczy z zakresu właściwości dendrymerów w celu ich wykorzystania jako nośniki substancji kontrastowych do obrazowania magnetycznym rezonansem jądrowym. Zagadnienia te stanowią przedmiot intensywnych badań. Świadczy o tym bogata literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w piśmiennictwie rozprawy doktorskiej. Na jej podstawie Doktorantka opracowała syntetyczny wstęp z ilustracją graficzną omawianych procesów i struktur chemicznych. Wstęp zawiera bogatą dokumentację omawianych zagadnień, które zostały poparte aktualnym piśmiennictwem. Literatura omawianych zagadnień została poprawnie dobrana tematycznie i w przeważającej części stanowi osiągnięcia ostatnich pięciu-dziesięciu lat w tej dziedzinie.

Zaprojektowane związki otrzymano standardowymi metodami syntezy chemicznej. Strukturę tych związków potwierdzono analizą elementarną, analizą widm NMR i IR. Świadczy to o profesjonalizmie warsztatowym doktorantki.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wysunęła hipotezę, że badane dendrymery mogą stanowić nośniki pochodnych kwasu imino-dioctowego, a uzyskane kompleksy gadolinowe można uznać za potencjalnie bezpieczne przy dalszych badaniach nad projektowaniem i optymalizacją właściwości tej grupy środków kontrastowych.

Przedstawione przez Doktorantkę badania pozwalają nakreślić dalsze kierunki badań nad doskonaleniem skuteczności i bezpieczeństwa dendrymerowych kompleksów środków kontrastowych.

Treść pracy doktorskiej została przedstawiona w postaci 83 rycin, 36 tabel i 8 schematów, które stanowią ilustrację obszernego zakresu badań i ogromu pracy Doktorantki. Na ich podstawie sformułowała 9 wniosków oraz dokonała podsumowania. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy.

Dyskusja zawiera konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz interpretuje uzyskane wyniki badań na podstawie bardzo obszernej literatury przedmiotu. Świadczy to o specjalistycznej wiedzy Autorki pracy i pozwala bardzo pozytywnie ocenić umiejętność

rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników.

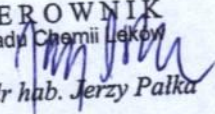
Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Markowicz-Piaseckiej jest pracą wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi nowe elementy poznawcze w zakresie wiedzy o zaletach i wadach dendrymerów jako potencjalnych nośników środków kontrastowych. Niektóre z zaprojektowanych związków mogą stanowić przedmiot dalszych badań z zakresu analizy strukturalnej, bioanalizy, toksykologii i diagnostyki klinicznej.

Bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Magdaleny Markowicz-Piaseckiej i składam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o jej wyróżnienie.

Głównym argumentem przemawiającym za wyróżnieniem niniejszej pracy jest jej oryginalna konstrukcja, łącząca analizę strukturalną związków z badaniami biologicznymi „in vitro”, bazująca na obszernej wiedzy z zakresu syntezy chemicznej, analizy strukturalnej i fizykochemicznej związków, badań biologicznych i specyficznej wiedzy o nowych kierunkach poszukiwań środków diagnostycznych do obrazowania metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Doskonała logistyka planu badawczego, łącznie z zastosowanymi technikami syntezy, analiz spektroskopowych i testach biologicznych stanowią fundament nowoczesnego warsztatu chemii leków. Uważam ponadto, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Markowicz-Piaseckiej jest bardzo starannie przygotowana merytorycznie, stanowi bardzo obszerny zakres badań i dokumentację wyników oraz wnosi cenne elementy poznawcze do wiedzy o dendrymerach PAMAM jako potencjalnych nośnikach kompleksów gadolinu z pochodnymi kwasu imino-dioctowego. Potwierdza to szereg prac autorstwa Doktorantki w wysokospecjalistycznych czasopismach o zasięgu światowym.

Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Magdaleny Markowicz-Piaseckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

22.07.2013.

KIEROWNIK  
Zakładu Chemii Leków  
  
prof. dr hab. Jerzy Pałka