



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

arkadiusz.surazynski@umb.edu.pl

Dr hab. n. farm. Arkadiusz Surażynski

Białystok, 07.03.2018.

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

PT.: "NOWE HYBRYDY POCHODNYCH TETRAHYDROAKRYDINY ORAZ CYKLOPENTACHINOLINY JAKO INHIBITORY ACETYLOCHOLINOESTERAZY O WIELOKIERUNKOWYM DZIAŁANIU" wykonanej przez mgr Kamilę Annę Czarnecką w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Przedmiotem badań stanowiących treść niniejszej pracy doktorskiej była synteza nowych związków, pochodnych tetrahydroakrydiny oraz cyklopentachinoliny o zdolności do hamowania cholinesterazy i powstawania amyloidu w celu poszukiwania potencjalnych czynników terapeutycznych chorób neurodegeneracyjnych.

Podjęcie tego zagadnienia jest szczególnie ważne z powodu wzrostu zapadalności na choroby cywilizacyjne o podłożu neurodegeneracyjnym. Choroby te mają charakter przewlekły i postępujący co bezpośrednio wpływa na pogorszenie stanu zdrowia pacjenta jak również eskaluje koszty w systemie ochrony zdrowia. Wśród zaburzeń o podłożu neurodegeneracyjnym ważne miejsce zajmuje choroba Alzheimera. Obecnie jest najczęstszą przyczyną otępienia, a w dalszych etapach prowadzi do zaniku funkcji mózgu a nawet śmierci. Mimo, iż została zidentyfikowana ponad 100 lat temu, nadal pozostaje wyzwaniem dla współczesnej medycyny i nauki. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających podłoże zaburzeń neurodegeneracyjnych w chorobie Alzheimera. Jednymi z najszerzej opisywanych jest tzw. hipoteza cholinergiczna, związana z deficytem neuroprzekaźnika acetylocholino w OUN oraz teoria kaskady β -amyloidu, związana z tworzeniem złogów tego białka, zakłócając komunikację neuronalną, prowadzącą do chorób neurodegeneracyjnych.

Niestety do tej pory nie udało się opracować skutecznego leku pozwalającego na odwrócenie lub zatrzymanie postępu choroby. Przyjmuje się, że bez przełomu w terapii choroby Alzheimera do 2050 roku liczba osób cierpiących na tą chorobę może wzrosnąć do ponad 130 milionów co stawia ją w niechlubnej czołówce chorób cywilizacyjnych. Obecnie koncepcje terapeutyczne zmierzają w kierunku projektowania leków o wielokierunkowym mechanizmie działania zdolnych do oddziaływania na różne cele molekularne zwane *Multitarget Directed Ligands*. Niesie to za sobą szereg korzyści zarówno farmakodynamicznych jak i farmakokinetycznych zwiększając skuteczność terapii i zmniejszając ilość działań niepożądanych. W to nowoczesne podejście do terapii chorób neurodegeneracyjnych wpisuje się praca doktorska mgr Kamili Czarneckiej.

Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za ważne z punktu widzenia poznawczego, metodologicznego, a także potencjalnie terapeutycznego. Doktorantka wykorzystała doświadczenie własne, bardzo dobrego zespołu badawczego, którego potencjał poznawczy i publikacyjny jest na poziomie światowym, co stanowi gwarancję rzetelności i poprawności uzyskanych wyników badań i wyciągniętych wniosków.

Wykorzystała również aktualną wiedzę z zakresu projektowania, syntezy i analizy substancji leczniczych oraz biologii komórki z wykorzystaniem modelowania molekularnego do wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania otrzymanych pochodnych na cele biologiczne. Świadczy o tym bogata literatura dotycząca tych zagadnień, zamieszczona w piśmiennictwie rozprawy doktorskiej, na podstawie której Doktorantka opracowała syntetyczny wstęp oraz zaplanowała metodologię badań. Literatura omawianych zagadnień stanowi osiągnięcia ostatnich 10 lat w tej dziedzinie.

We wstępie Doktorantka wiele miejsca poświęciła wprowadzeniu czytelnika w wiedzę na temat epidemiologii, patogenezы oraz terapii chorób o podłożu neurodegeneracyjnym szczególnie skupiając się na chorobie Alzheimera. Przedstawiła hipotezy opisujące patogenezę tej choroby oraz jej współczesną farmakoterapię opierającą się na nowej koncepcji projektowania leków, której podstawą jest zdolność jednego związku do oddziaływania na różne cele terapeutyczne, a w związku z tym poprawiającą skuteczność terapeutyczną.

Doktorantka podjęła badania, których celem było uzyskanie związków hybrydowych zdolnych do oddziaływania na wiele procesów w chorobie Alzheimera jednocześnie. Wykorzystała pochodne tetrahydroakrydyny oraz cyklopentachinoliny o potwierdzonym w literaturze działaniu hamującym cholinesterazy i połączyła je z podstawnikami aby przy zachowaniu podstawowego działania – hamującego cholinesterazy posiadały dodatkowe korzystne właściwości biologiczne i zdolność hamowania powstawania agregatów beta-amyloidu. W związku z tym zaplanowała i zrealizowała syntezę 14 nowych, innowacyjnych związków - trzech pochodnych tetrahydroakrydyny z kwasem 2-fluorobenzoowym, trzech pochodnych tetrahydroakrydyny z kwasem 3-fluorobenzoowym oraz osiem pochodnych cyklopentachinoliny z kwasem 5,6-dichloronikotynowym - nowych hybryd o potencjalnym korzystnym działaniu biologicznym. Następnie potwierdziła struktury chemiczne wyżej wymienionych pochodnych przy pomocy nowoczesnych metod spektroskopowych IR, ¹H-NMR, MS, MS-HR. Analiza widm nie budzi żadnych wątpliwości co do jakości i czystości otrzymanych związków. Wykazała zdolność hamowania cholinesteraz (acetylocholinesteraza AChE oraz butyrylocholinesteraza BuChE) oraz hamowania agregacji β-amyloidu przez nowo zsyntetyzowane związki. Wykonała badania kinetyki enzymatycznej dla najaktywniejszych pochodnych, wyznaczyła parametry K_m i V_{max} oraz określiła typ inhibicji dla wybranych związków, który dla wszystkich badanych substancji okazał się typem mieszanym. Wśród hybryd kwasu fluorobenzoowego najaktywniejszym związkiem był chlorowodorek 2-fluoro-N-[4-(1,2,3,4-tetrahydroakrydino-9-ylamino)butylo] benzamidu dla którego IC_{50} w stosunku do AChE wynosi 41,37 nM. Dla pochodnych kwasu 5,6-dichloronikotynowego najaktywniejszym związkiem w stosunku do tego samego enzymu był chlorowodorek 5,6 - dichloro - N - [3 - (2,3 - dihydro -1H - cyklopenta[b]chinolino - 9 -ylamino) propylo] nikotynamidu z IC_{50} =52,12 nM. Następnie Doktorantka wykonała analizę wpływu związków na żywotność wybranych linii komórkowych. Badania wykazały, że w stężeniu bliskim ich wartości IC_{50} przeżywalność komórek była wysoka, co wskazuje na bezpieczeństwo stosowania otrzymanych hybryd. W ostatnim etapie pracy wyjaśniła mechanizmy oddziaływania otrzymanych pochodnych na cele biologiczne za pomocą nowoczesnej metody jaką jest modelowanie molekularne. Łącząc powyższe właściwości w jednej cząsteczce otrzymano związki o bardzo obiecującym potencjale zastosowania w chorobie Alzheimera.

Treść pracy doktorskiej została przedstawiona w postaci 8 rycin, 4 tabel, 7 wykresów i 4 schematów. Stanowią one obszerną dokumentację pracy doświadczalnej Doktorantki oraz ułatwiają zrozumienie koncepcji pracy. Szczególną uwagę zwraca opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego i profesjonalizm badawczy. Na podstawie wyników obszernych badań

Doktorantka sformułował 8 wniosków. Odzwierciedlają one najistotniejsze elementy poznawcze pracy.

Wyniki połączone z dyskusją zawierają konkluzje przedstawione w części doświadczalnej oraz interpretują uzyskane wyniki badań na podstawie obszernej, aktualnej literatury przedmiotu. Pozwala to bardzo pozytywnie ocenić specjalistyczną wiedzę Doktorantki, umiejętność rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników.

Należy również podkreślić, że otrzymane wyniki zostały opublikowane w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Łączny IF prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi ponad 15. Ponadto sposób wytwarzania N-podstawionych związków takryny uzyskał zgłoszenie patentowe.

Niemniej jednak Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów, które nie mają wpływu na jakość rozprawy a jedynie przytaczam je z obowiązku recenzenta.

Na stronie 43 opis wyniku dotyczy związku umieszczonego w tabeli pod nr „2h” a w tekście „2g” podobnie na stronie 51 w dyskusja zostały zamienione nr wykresów 4 z 5

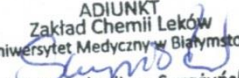
Niektóre zagadnienia zamieszczone w rozprawie doktorskiej nie są jasno sformułowane, rodzą pytania lub mogą stanowić przedmiot dyskusji, na przykład:

1. Dobór stężeń przy ocenie bezwzględnej aktywności otrzymanych związków, kinetyki reakcji enzymatycznej, hamowania agregacji beta-amyloidu oraz badania przeżywalności wybranej linii komórkowej, znacząco odbiega od IC50 uzyskanych w badaniu aktywności enzymatycznej.
2. Dobór komórek na których wykonano test cytotoksyczności. Czy nie lepiej, zważywszy na hepatotoksyczne właściwości takryny, użyć do tego hepatocytów np.: HeLA cells.

Powyższe pytania nie mają charakteru uwag krytycznych, mogą natomiast stanowić inspirację do doskonalenia warsztatu badawczego oraz dyskusji nad potencjalnym wykorzystaniem wyników badań w eksperymentalnej terapii choroby Alzheimera.

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska mgr Kamili Anny Czarneckiej jest pracą bardzo wartościową, poprawnie przygotowaną warsztatowo i wnosi elementy poznawcze w zakresie wiedzy o hybrydowych związkach hamujących powstawanie kompleksów beta-amyloidu oraz aktywności cholinioesterazy o potencjalnym zastosowaniu w chorobach neurodegeneracyjnych.

Upoważnia mnie to do wystąpienia z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr Kamili Anny Czarneckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

ADIUNKT
Zakład Chemii Leków
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

dr hab. Arkadiusz Surażyński