



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

Recenzja pracy doktorskiej mgr Niny Chufarowej

„Novel multifunctional acridine hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease treatment”

JEDNYM z największych współczesnych wyzwań dla ludzkości jest walka z chorobami neurodegeneracyjnymi, które — mimo ogromnego postępu nauk medycznych i farmaceutycznych — dalej zbierają zbyt duże żniwo na całym świecie. Choroba Alzheimera (AD) jest jedną z częściej spotykanych, odpowiada bowiem za połowę przypadków starczej demencji, a przewidywania mówią o wzroście odsetka zachorowań do około 1,2% ogółu populacji w 2050 roku.

Mimo znacznego poszerzenia wiedzy z zakresu jej etiologii, współczesna terapia bazuje tylko na leczeniu objawowym, oscylując wokół pięciu zarejestrowanych leków: takryny, rywastygminy, donepezilu, galantaminy oraz memantyny.

Cele molekularne terapii są nadal znacznie ograniczone, jednakże niezależnie od poszukiwania nowych sposobów leczenia prowadzi się intensywne prace dotyczące coraz lepszych leków działających na cele znane. Synteza i badanie aktywności nowych substancji o potencjalnym działaniu przeciwneurodegeneracyjnym jest ważnym i wartym nakładu wątkiem we współczesnej nauce.

W ten trend badawczy wpisuje się dysertacja doktorska mgr NINY CHUFAROWEJ, wykonana w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. PAWŁA SZYMAŃSKIEGO, prof. UM.

Rozprawa liczy 158 stron i jest napisana w języku angielskim w typowym dla dysertacji doktorskich układzie: streszczenie z celem pracy (w tym w języku polskim), lista skrótów, wstęp, część teoretyczna, część doświadczalna, wyniki, dyskusja oraz piśmiennictwo. Badania zostały wykonane w ramach wewnętrznego grantu UM (502-02/3-015-01/502-34-090).

Część teoretyczna zawiera opis choroby Alzheimera wraz z aktualnymi statystykami, następnie Autorka przedstawia w kolejnych rozdziałach najważniejsze modele etiologiczne: teorię cholinergiczną (ze szczególnym uwzględnieniem roli acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy oraz struktury celów molekularnych na tych enzymach), teorię amyloidową, teorię tau oraz czynniki stresu oksydacyjnego.

W części teoretycznej Autorka używa (jakże dziś rzadkiej) narracji dysertacyjnej, podkreślającej określone, starannie wyselekcjonowane fakty z dotychczasowej wiedzy. Świadczy to o dogłębnym zapoznaniu się z literaturą oraz właściwym umieszczeniu swojego pomysłu w kontekście wcześniejszych dokonań w tym zakresie. Na uwagę zasługuje ogromna bibliografia dysertacji, składająca się aż z 408 pozycji, a jej lektura skłania ku stwierdzeniu, że nie są to prace przypadkowe, lecz prawdopodobnie wybrane starannie z jeszcze większej liczby przeanalizowanych pozycji.

W części doświadczalnej, w pierwszej kolejności doktorantka podjęła syntezę ośmiu związków już wcześniej otrzymanych w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, stanowiących pochodne akrydyny ze zmienną długością łańcucha podstawnika bocznego.

Właściwy cel zakładał otrzymanie dwóch serii po 8 nowych związków ([N-(1,2,3,4,-tetrahydroakrydyn-9-yloamino)alkilo]akrydino-9-karboksyamidów, z czego jedna seria to chlorowodorki drugiej) różniących się długością łańcucha alifatycznego w cząsteczce. Wcześniejsze, te znane już związki, użyto jako substratu do reakcji syntezy. Każdy ze związków został otrzymany w czystości chromatograficznej, a jego tożsamość została potwierdzona badaniami NMR, IR oraz MS. Dodatkowo opisano właściwości fizykochemiczne oraz ustalono temperaturę topnienia.

Następnie 8 nowych związków w formie chlorowodorków Autorka przebadła testami płytkowymi metodą Ellmana pod kątem aktywności względem acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy. Otrzymane wyniki wykazały, że jeden ze związków (oznaczony 3d i zawierający pięcioatomowy łańcuch alifatyczny), wykazuje znacznie większą aktywność względem obu tych enzymów w porównaniu do pozostałych substancji.

Dlatego też Doktorantka zdecydowała się przebadać ten jeden związek szerzej. Wyznaczyła kinetykę reakcji enzymatycznej dla dwóch poziomów badanego związku i porównała ją z kinetyką reakcji bez jego obecności. Wyniki dopasowano do modelu MICHAELISA-MENTEN, a oba jego parametry ulegały zmianie wraz ze zmianą ilości badanej substancji. Dopasowane proste przecinały się w jednym punkcie w czwartej ćwiartce wykresu. Te wyniki sugerują, że inhibicja enzymu ma mieszany mechanizm działania.

Powyższy związek został również zbadany pod kątem hamowania agregacji amyloidu beta (popularnym testem $A\beta$) i wyniki okazały się obiecujące — w stężeniu 100 μM związek zatrzymywał blisko 60% agregacji tego białka.

Dla wszystkich związków zbadano również cytotoksyczność na linii komórkowej raka płuc CCL-185. Wszystkie (poza związkiem 3b) wykazały się istotną cytotoksycznością w większych stężeniach, w zasadzie dopiero w stężeniu 100 μM . Cytotoksyczność jest zbliżona, przy czym dla związku 3d jest jedną z najmniejszych zaobserwowanych.

Związek 3d został następnie przebadany *in silico* pod kątem dokowania do znanych modeli enzymów (4M0F — model kompleksu acetylocholino z territremem oraz 4TPK — model kompleksu butyrylocholinoesterazy z N-((1-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)piperidyn-3-ylo)metylo)-N-(2-metoksyetylo)-2-naftyloamidem). Symulacje potwierdziły powinowactwo związku do miejsc aktywnych i pozwoliły na wyodrębnienie dwóch sposobów przyłączania się do acetylocholinoesterazy oraz jednego — jednakże odmiennego — do butyrylocholinoesterazy.

Rozprawa stanowi całościowy, dobrze skonstruowany, jak również udany projekt badawczy. Dla wszystkich nowych substancji opracowano i sprawdzono ścieżki syntezy o dużej wydajności. Dodatkowo cała procedura miała poprawny ciąg przyczynowo-skutkowy, gdzie tylko jeden związek wybrany w badaniach bardziej przesiewowych został przebadany bardziej całościowo. Świadczy to o właściwym podejściu Doktorantki do aktualnych trendów w poszukiwaniu nowych potencjalnych leków. Dostrzegam szerokie możliwości kontynuacji zaprezentowanych badań.

Z obowiązku recenzenta chciałbym przedstawić kilka drobnych uwag, które ułatwią publikowanie wyników badań niniejszej dysertacji:

1. Czy związki już wcześniej otrzymane, oznaczone jako 1a-1h, mają jakiegokolwiek działanie lecznicze? Odpowiedzi nie zawiera ani dysertacja, ani też praca cytowana pod numerem 394. W obu przypadkach były one wyłącznie substratami do dalszych syntez.
2. W przypadku dyskusowania istotności różnic, brakuje mi komentarza jakie testy statystyczne były używane, a przede wszystkim uzyskanych tymi testami wartości p .
3. Zamieściłbym tabelę zawierającą parametry prostych z regresji na wykresie Lineweavera-Burka, wraz z błędem standardowym i przedziałem ufności (wykazującą, że te parametry istotnie się różnią). Dodatkowo dobrze byłoby oszacować położenie przecięcia trzech prostych w ćwiartce IV wraz z dyskusją błędu tego oszacowania.
4. Wykres Lineweavera-Burka przedstawia dane transformowane, zatem rozkład błędu nie musi być normalny i nie ma pewności co do wartości poznawczej błędów regresji. Dla porównania zastosowałbym ocenę niepewności estymacji parametrów techniką bootstrap.
5. Dane z wykresu 17 warto również dopasować do liniowego modelu oraz ocenić istotność nachylenia otrzymanej prostej.
6. Czy optymalizacja geometrii techniką dynamiki i mechaniki molekularnej była w tym przypadku wystarczająca do dokowania, czy przydatne byłoby zastosowanie przynajmniej semiempirycznego poziomu teorii?
7. Co w procesie dokowania mogło się zmieniać — czy tylko położenie cząsteczki w miejscu wiązania, czy również jej geometria, a może nawet geometria miejsca aktywnego? Wszystkie te warianty są stosowane obecnie w dokowaniu i często dają odmienne wyniki.

Wyniki przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej stanowią materiał do kilku publikacji na wysokim poziomie w punktowanych czasopismach. Dostrzegam w nich spory potencjał i przewiduję istotne zainteresowanie tymi wynikami przez inne grupy badawcze.

Podsumowując, praca doktorska Niny Chufarovej spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuje o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo ze względu na aktualność tematyki badawczej, pionierskość przeprowadzonych badań, a przede wszystkim istotny wkład niniejszej pracy doktorskiej w terapię choroby Alzheimera, wnioskuje o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji pracy.

Lublin, 13 lipca 2018.

Katedra i Zakład Chemii Leków
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

prof. dr hab. Łukasz Komsta