



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-31
fax: 61 854-66-39
e-mail: syntezy@ump.edu.pl

prof. dr hab. Tomasz Gośliński

Poznań, dnia 31 sierpnia 2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł pracy: **Novel multifunctional acridine hybrids as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease treatment**

Imię i nazwisko: **mgr Nina Chufarova**

Miejsce realizacji pracy doktorskiej: **Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

Promotor: **prof. dr hab. Paweł Szymański**

Pani mgr Nina Chufarova w ramach pracy doktorskiej podjęła się poszukiwań substancji aktywnych farmaceutycznie dla potrzeb terapii choroby Alzheimera. Dysertacja jest bogata warsztatowo zarówno w zróżnicowane metody syntezy chemicznej, badania biochemiczne, jak i metody obliczeniowe. Zagadnienia czysto badawcze podjęte w pracy włączają się w tematykę wykraczającą poza stereotypowe rozumienie substancji aktywnej, działającej na jeden określony receptor, czy enzym. Poszerzają to spojrzenie, ukierunkowując na związki aktywne biologicznie posiadające różne punkty uchwytu. To podejście wymaga opracowania związku hybrydowego lub koniugatu, który w swojej budowie zawiera motywy strukturalne umożliwiające wielokierunkowe działanie. Należy podkreślić, że ten trudny i multidyscyplinarny temat jest rozwijany od kilku lat z bardzo interesującymi rezultatami w Katedrze Chemii Farmaceutycznej pod kierunkiem promotora niniejszej pracy, Pana prof. dr. hab. Pawła Szymańskiego. Temat ambitny, bo przecież poszukiwanie leków mających służyć leczeniu chorób, u podstaw których znajdują się procesy neurodegeneracyjne, opiera się często na hipotezach i intuicji badawczej. W dysertacji Doktorantka dotyka z jednej strony zagadnień czysto poznawczych, zmierzających do opracowania i zbadania nowych związków działających na określone enzymy. Z drugiej strony Jej badania stwarzają perspektywy bardzo praktyczne, które mogą przyczynić się do znalezienia substancji aktywnych farmaceutycznie dla zastosowań w leczeniu choroby Alzheimera. Badania prowadzone w tym zakresie są wciąż aktualne, ważne i doceniane przez społeczność naukową. Stały się podstawą przyznania Nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 2000 r. dla trzech badaczy, w tym Paula Greengarda, którzy zajmowali się przykazywaniem sygnałów w układzie nerwowym. Warto dodać, że Paul Greengard ostatnie lata swojej aktywności naukowej poświęcił właśnie określaniu roli fosforylacji białek przy tworzeniu się beta-amyloidu i molekularnym podstawom choroby Alzheimera. Z tego względu sformułowane w temacie pracy zagadnienie badawcze dotyczące poszukiwań **nowych wielofunkcyjnych hybryd akrydynowych jako**

inhibitorów acetylocholinoesterazy dla leczenia choroby Alzheimera jest niezwykle istotne w obliczu dużego zapotrzebowania na skuteczne i bezpieczne leki o wielokierunkowym działaniu do terapii tej choroby. Wynikiem badań może być wiedza przydatna do rozwikłania problemu znalezienia skutecznego leku, z którym boryka się od lat neurofarmakologia. Wydaje się, że opracowanie nowych leków o wielokierunkowym działaniu w chorobie Alzheimera pozwoli wzmocnić efekt terapeutyczny oraz zminimalizować działania uboczne. Koncepcja badań jest zgodna z tezami dotyczącymi leczenia chorób neurodegeneracyjnych z wykorzystaniem leków o wielokierunkowym działaniu, a jej podstawy dali Andrea Cavalli i wsp. w słynnym artykule opublikowanym dziesięć lat temu w *Journal of Medicinal Chemistry* (51, 2008, 347-372) pt. „*Multi-target-Directed Ligands To Combat Neurodegenerative Diseases*”. Z tego względu uważam, że dokonany przez Doktorantkę wybór tematu jest jak najbardziej uzasadniony.

Rozprawa doktorska Pani mgr Niny Chufarovej stanowi spójne tematycznie 158 stronicowe opracowanie, które zostało napisane poprawnym naukowym językiem angielskim. Doktorantka na początku dysertacji zawarła informację dotyczącą sposobu finansowania badań. Dowiadujemy się, że przedstawione badania stanowią realizację projektu finansowanego przez Wydział Farmaceutyczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Praca doktorska zawiera wszystkie wymagane rozdziały oraz szereg informacji uzupełniających tj. streszczenia w języku angielskim i polskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie ze zdefiniowanym celem pracy, część teoretyczną, część doświadczalną zawierającą odczynniki i procedury chemiczne i biologiczne, wyniki badań własnych, dyskusję wyników wraz ze wskazaniem przyszłych kierunków badań, podsumowanie oraz piśmiennictwo. Kolejność rozdziałów w rozprawie i cytowane piśmiennictwo nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Rozprawa zawiera starannie przygotowane: 24 ryciny i 26 tabel, które znacznie ułatwiają zrozumienie omawianych badań. Piśmiennictwo liczy aż 408 odnośników literaturowych, które zostały odpowiednio dobrane i odnoszą się zarówno do czasopism naukowych, jak i książek i stron internetowych, w większości z ostatnich 15 lat.

Pani mgr Nina Chufarova dokonała właściwego wyboru tematyki do **wprowadzenia**, w którym nakreśliła problematykę chorób neurodegeneracyjnych, w szczególności choroby Alzheimera i przedstawiła cele badań własnych. Zwróciła uwagę na niewielką wiedzę na temat samego patomechanizmu tej choroby i powiązanych z tym brakiem skutecznych leków. Nakreśliła koncepcje leczenia choroby Alzheimera związane zarówno z zaobserwowanym odkładaniem się β -amyloidu w komórkach nerwowych (hipoteza amyloidowa), tworzeniem się spletek neurofibrylarnych hiperfosforylowanego białka tau wewnątrz komórek nerwowych mózgu oraz obniżoną aktywnością acetylotransferazy cholinowej w neuronach cholinergicznym (hipoteza cholinergiczna). Zwróciła uwagę, że leki opracowane dla potrzeb terapii zapewniają wyłącznie leczenie objawowe. Poruszyła też ważny z punktu widzenia prowadzonych w pracy badań temat 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny, czyli takryny, odwracalnego inhibitora acetylocholinoesterazy, którego niestety dobroczynne działanie farmakologiczne jest skutecznie znoszone przez bardzo poważne działania niepożądane. Następnie omówiła ważne dla prowadzonych badań zagadnienie, związane z modyfikacjami takryny i jej połączeniami z innymi związkami. Podstawą do badań własnych są opisane w tym miejscu dimery takryn połączone różnej długości łańcuchami alifatycznymi oraz połączenia takryn z innymi związkami niż pochodne tetrahydroakrydyn. Ten drugi typ pochodnych wydał się

Doktorantce bardziej interesujący z uwagi na możliwe wielokierunkowe działania i pozwolił na sformułowanie **celów** badań. Cele miały zostać zrealizowane szczegółowo poprzez: syntezę i charakterystykę fizykochemiczną połączeń takrynowo-akrydynowych, ocenę aktywności biologicznej związków jako inhibitorów AChE i BuChE, studia kinetyczne w zakresie hamowania AChE i biologiczne dotyczące hamowania A β , ocenę cytotoksyczności związków i studia molekularnego modelowania z użyciem najbardziej aktywnego związku. W szerszym znaczeniu chodziło także o poszerzenie wiedzy dotyczącej możliwości zastosowania połączeń takrynowo-akrydynowych w terapii choroby Alzheimera.

Materiał literaturowy na temat przedmiotu badań został starannie zebrany i podsumowany w **części teoretycznej**. Stanowi on tym samym zwarte oraz bardzo kompletne kompendium, które sprawia, że podjęte w pracy zagadnienia, zdefiniowany cel, wyniki i ich omówienie oraz wnioski wydają się naturalnie wpisywać w analizowane problemy. Doktorantka poruszyła w sposób bardzo szczegółowy następujące zagadnienia: (i) choroba Alzheimera, (ii) teoria cholinergiczna, budowa i rola acetylo- i butyrylocholinoesteraz, (iii) teoria amyloidowa, z omówieniem roli i możliwości zastosowania w terapii inhibitorów sekretaz, (iv) teoria związana z białkiem tau, budową, znaczeniem nieprawidłowości w budowie na funkcję biochemiczną, powstawanie neurofibrylarnych splątków, znaczenie procesu fosforylacji białka tau i możliwości regulacji tego procesu, (v) wpływ procesów zapalnych tkanki nerwowej i stresu oksydacyjnego na chorobę Alzheimera. Dużą uwagę poświęciła stosowanym terapiom i lekom. Skupiła się także na omówieniu znaczenia w terapii substancji aktywnych farmaceutycznie o wielokierunkowym działaniu z uwzględnieniem następujących celów molekularnych, jak białko A β , białko tau, receptory (cholinergiczny, glutaminergiczny, noradrenergiczny, histaminergiczny) oraz enzymy (AChE, BuChE, β - i γ -sekretazy, oksydazy monoaminowe A i B). Uzasadnienie do rozwijania grupy leków wielofunkcyjnych znalazła w bardzo zróżnicowanych mechanizmach działania obecnie stosowanych leków z grupy inhibitorów AChE. Duży fragment rozdziału poświęciła takrynie, jej aktywności farmakologicznej, działaniom niepożądanym i dotychczas uzyskanym połączeniom, które z kolei przedstawiła z uwzględnieniem aktywności hamującej cholinoesterazę oraz: (i) A β antyagregacyjnej, (ii) hamującej β -sekretazę, (iii) antyoksydacyjnej, (iv) zdolności do uwalniania tlenu azotu, (v) neuroprotektoryjnej, (vi) chelatującej jony metali, (vii) hamującej oksydazę monoaminową, (viii) tau antyagregacyjnej.

W rozdziale **Materiały i metody** Doktorantka zawarła spis stosowanych reagentów, odczynników i aparatury, preparatykę związków niepublikowanych, czyli serii ośmiu 9-podstawionych pochodnych tetrahydroakrydyny, ich ośmiu koniugatów z akrydyną oraz ośmiu pochodnych soli. W kilku tabelach zebrała właściwości fizykochemiczne tych związków: kolor, temp. topnienia, ¹H NMR, IR, MS i HR MS. Następnie podała opis procedur badań biologicznych, w tym hamowania AChE, BuChE, studia kinetyczne hamowania AChE, badania A β , badania cytotoksyczności. Ostatnia część objęła metodykę molekularnego modelowania, ocenę wiązania ligandów do AChE i BuChE. W rozdziale **Wyniki** Pani mgr Nina Chufarova przedstawiła najpierw otrzymywanie serii połączeń takrynowo-akrydynowych posiadających zróżnicowaną długość łańcucha alifatycznego. Metodyka syntez związków zawierała sekwencje kolejno po sobie następujących reakcji typu podstawienia 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroakrydyny serią diamin różniących się długością łańcuchów alkilowych, estryfikacji uzyskanych ω -aminowych pochodnych kwasem 9-akrydynokarboksylowym, a w końcowym etapie

otrzymania 8 rozpuszczalnych w wodzie chlorowodorków uzyskanych koniugatów. Związki zostały poddane badaniom enzymatycznym, pozwalającym na ocenę hamowania acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy. W trakcie badań kinetycznych Doktorantka uzyskała najwyższą aktywność dla koniugatu z łańcuchem pentylowym, gdyż IC_{50} wyniosło odpowiednio 7,6 pM dla AChE i 1,7 pM dla BuChE. Warto dodać, że wartości referencyjne IC_{50} dla takryny wyniosły 89914,1 pM dla AChE i 14982,4 pM dla BuChE. Co ciekawe, wszystkie uzyskane związki hamowały AChE i BuChE dużo lepiej niż takryna, odpowiednio 620-11830 razy i 6-8813 razy. Warto podkreślić, że niektóre badane związki, w szczególności koniugaty z łańcuchem etylowym i oktylowym wykazały interesującą wybiórczość względem BuChE (selektywność odpowiednio 68,68 i 17,47). Związek z łańcuchem pentylowym został dodatkowo poddany studiom kinetycznym w kierunku hamowania AChE. Do oceny zdolności hamowania agregacji β -amyloidu Doktorantka użyła najbardziej aktywny koniugat z łańcuchem pentylowym. Badania pozwoliły na wykazanie hamowania agregacji $A\beta$ w zakresie od 31,66% przy stężeniu 10 μ M do 57,77% przy stężeniu 100 μ M. Wielodyscyplinarne badania nabierały coraz większego tempa, a Doktorantka w trakcie realizacji pracy stawiała sobie nowe cele. Związki poddała badaniom cytotoksyczności na linii komórkowej nabłonkopodobnej ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca ATCC CCL-185 w zakresie stężeń od 0,1 do 100 μ mol, co pozwoliło na wykluczenie istotnej cytotoksyczności do 10 μ mol. Ostatnia część badań Pani mgr Niny Chufarovej dotyczyła wykonania modelowania molekularnego dla najaktywniejszego związku tj. koniugatu z linkerem pentylowym. W tym celu Doktorantka zoptymalizowała strukturę trójwymiarową badanego związku na potrzeby dokowania w miejscu farmakoforowym enzymów AChE i BuChE. Następnie przeanalizowała sposób wiązania cząsteczki w miejscu farmakoforowym oraz wskazała na fragmenty struktury wnęki enzymatycznej i cząsteczki biorące udział w oddziaływaniach. Wyniki badań powiązała ciekawą i krytyczną dyskusją, wskazując na znaczenie oddziaływania związku z katalitycznym miejscem anionowym. Studia obliczeniowe powiązane z wynikami badań enzymatycznych i cytotoksycznością stanowią dobrą podbudowę do dalszych zaawansowanych studiów *in vitro* i *in vivo*. Należy podkreślić, że badania obliczeniowe wskazały, co prawda, na pożądane właściwości struktury wiodącej, ale pokazały także potencjał całej serii uzyskanych związków do dalszych badań. Myślę, że bardzo interesująca byłaby w przyszłości analiza porównawcza dla całej serii 8 związków. Dopelnieniem prezentacji wyników jest rozdział **Dyskusja i dalsze kierunki badań**, w którym Doktorantka podkreśliła znaczenie poszukiwań nowych leków o wielokierunkowym działaniu na chorobę Alzheimera. Nawiązując do założeń i wyników badań własnych stwierdziła, że leków tych należy szukać w obrębie inhibitorów AChE/BuChE z dodatkowymi punktami uchwytu i powiązanych z tym aktywnościami. Dobrze jeżeli przeprowadzone badania nie zamykają i nie stanowią dla naukowca granicy eksplorowania interesującego jego zagadnienia. Tak jest i w tym przypadku. Pani Magister wskazała perspektywy dalszych badań i znaczenie dalszej oceny uzyskanych związków pod kątem aktywności antyoksydacyjnej, przeciwzapalnej, hamowania białka tau i hamowania sekretaz. Dostrzegła także interesujące zagadnienia do dalszych badań, jak ocena przechodzenia związków przez barierę krew-mózg oraz konieczność wykonania pogłębionej analizy QSAR.

Treść rozprawy doktorskiej Pani mgr Niny Chufarovej jest zgodna z tezą postawioną w tytule. Podjęty cel pracy został poprawnie zrealizowany w części eksperymentalnej, przedstawiony w wynikach i ich omówieniu, a także podsumowany w dyskusji oraz streszczeniu. Hipoteza zawarta na początku badań dotycząca w szerokiej

perspektywie znalezienia potencjalnych **nowych wielofunkcyjnych hybryd akrydynowych jako inhibitorów acetylocholinoesterazy dla leczenia choroby Alzheimera** na styku stosowania zaawansowanych metod chemii organicznej, chemii medycznej i biochemii, wydawała się bardzo racjonalna. W miarę postępu prac badawczych została pozytywnie zweryfikowana i doprowadziła do interesujących wyników i wniosków. Dane eksperymentalne uzyskane w badaniach biologicznych dla nowych związków są bardzo interesujące w kontekście zaprezentowanego w części literaturowej światowego piśmiennictwa. Uzyskane wyniki, ich dyskusja i przedstawione perspektywy mają więc duże znaczenie poznawcze, wnosząc tym samym ważne przesłanki do projektowania nowych substancji aktywnych o potencjalnym zastosowaniu w terapii choroby Alzheimera. Przedstawiona do recenzji praca doktorska posiada trzy płaszczyzny pozwalające ją analizować jako nowatorską: (i) podjęcie zagadnień bardzo aktualnych naukowo i społecznie poprzez włączenie się w nurt poszukiwania nowych i skuteczniejszych leków na chorobę Alzheimera, (ii) zastosowany wielodyscyplinarny i bogaty warsztatowo program badań, zarówno pod względem doboru technik syntetycznych, charakterystyki fizykochemicznej, badań enzymatycznych, jak i obliczeniowych oraz (iii) duży potencjał poznawczy i aplikacyjny przeprowadzonych badań związany z opracowaniem serii kilku wartościowych substancji aktywnych biologicznie.

Podczas lektury pracy nasunęło mi się kilka pytań o charakterze dyskusyjnym, o których komentarz chciałbym poprosić Doktorantkę podczas publicznej obrony pracy: (i) Hybryda czy koniugat? Kiedy bardziej stosowne jest użycie słowa koniugat, a kiedy hybryda w kontekście uzyskiwanych połączeń związków?, (ii) Czy umieszczenie akrydyny w strukturze związku zdaniem Doktorantki może wpływać na generowanie, czy też bardziej na usuwanie reaktywnych form tlenu?, (iii) Czy do oceny cytotoksyczności rozważano zastosowanie linii komórek zdrowych, oprócz nowotworowych?, (iv) Czy na podstawie uzyskanych danych ^1H NMR można pokusić się o określenie miejsca protonowania azotu i tworzenia soli w związkach 3a-h?

Zwracam także uwagę na drobne kwestie edytorskie, na które napotkałem w pracy: (i) s. 37 – należało wskazać Ryc. 3 na s. 37, s. 54 – należało wskazać na Ryc. 12 na s. 55, s. 101 – należało wskazać na Ryc. 20, str. 102; (ii) usterki graficzne: s. 42 (Ryc. 5 – w nazwie związku po lewej stronie wskazano na obecność grupy 2-etylo), s. 45 (Ryc. 7), s. 52 (Ryc. 10), s. 47 (Ryc. 8 – w strukturze związku w górnej części umieszczono ester kwasu azotowego); s. 49, 50 – powtórzenie Ryc. 9, (iii) s. 59 – Jaką technikę chromatograficzną zastosowano do oczyszczenia związków 1a-1h oraz 2a-2h? , (iv) Tabele 1-3, 5-11, 14-19, tytuły 3.3.2., 3.3.3, 4.1.1.-4.1.3., nazwa związku 3h na s. 112 – nieścisłości w nazewnictwie dla łączników alkilowych lub pozycji podstawnika, (v) Sugerowałbym podawanie ilości rozpuszczalników w ml (Tabela 2, s. 62), (vi) Sugerowałbym podawanie stałej J po zaokrągleniu do najbliższej wartości 0,5, żeby uniknąć rozbieżności w odczycie stałych J z widma na poziomie przekraczającym błąd ostatniej cyfry znaczącej dla grup w obrębie tych samych układów spinowych (Tabela 4, s. 65), (vii) s. 81 - Czy chodziło o 36% HCl przy przygotowywaniu buforu?, (viii) Drobne nieścisłości w referencjach 7, 16, 296, 297, 396.

Reasumując uważam, że Pani mgr Nina Chufarova bardzo dobrze zmierzyła się z postawionym w temacie pracy problemem, wykazała się znajomością zagadnień teoretycznych i przygotowaniem warsztatowym, umiejętnie łącząc wiedzę z zakresu syntezy organicznej, chemii medycznej i biochemii. Przekazana do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, zgodnie

z Ustawą z dnia 14 marca 2003 - O stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz.U. RP nr 65, poz. 595 z 2003 r. wraz z późniejszymi zmianami, w tym Ustawą z dnia 28 kwietnia 2017 r. – O zmianie ustawy o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki – Dz.U. RP poz. 859 z 2017 r., dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr Niny Chufarovej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Tomasz Gośliński