

Sosnowiec, 09.02.2021r.

Ocena pracy doktorskiej pt.

***Innowacyjne hybrydy tetrahydroakrydyny z komponentem przeciwzapalnym***

Katedra i Zakład Chemii  
i Analizy leków

Wydział Nauk Farmaceutycznych  
w Sosnowcu

Śląski  
Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach

ul. Jagiellońska 4  
41-200 Sosnowiec  
www.chemialekow.sum.edu.pl

wykonanej przez  
**mgr farm. Kamila Zawadę**

**w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji – Katedrze  
Chemii Farmaceutycznej  
Wydziału Farmaceutycznego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Dr hab.n.farm.  
Artur Beberok, prof. SUM  
tel.: (+48 32) 364 10 50  
abeberok@sum.edu.pl

SEKRETARIAT  
tel./fax: (+48 32) 364 10 50  
chemlek@sum.edu.pl

Choroba Alzheimera jest najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną na świecie. Ma charakter postępujący, a na jej złożoną patogenezę składa się wiele czynników i wielokierunkowy mechanizm biologiczny. Pomimo wielu badań ukierunkowanych na charakterystykę szlaków sygnalizacyjnych leżących u podstaw rozwoju choroby, dokładna etiologia choroby Alzheimera nie została określona, a stosowane metody leczenia pozwalają jedynie spowolnić jej przebieg.

Wyniki przeprowadzonych badań skupiających się na patofizjologii choroby Alzheimera wskazują na kilka istotnych czynników, które znacząco przyczyniają się do jej rozwoju. Charakterystyczne dla tej choroby są i/zaburzenia w funkcjonowaniu układu cholinergicznego i glutaminergicznego, ii/ utrata komórek nerwowych w mózgu, iii/ odkładanie się w ośrodkowym układzie nerwowym zewnątrzkomórkowych depozytów amyloidu- $\beta$ , iv/ występowanie przewlekłych stanów zapalnych o obrębie ośrodkowego układu nerwowego, v/ zaburzenia homeostazy biometali i wzrost stężenia metali ciężkich.

Na podstawie hipotezy cholinergicznego rozwoju choroby Alzheimera opierają się obecne i ogólnie przyjęte konwencjonalne metody leczenia. W 1993 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków wprowadziła pierwszy lek – takrynę do stosowania w terapii choroby Alzheimera, który wykazuje odwracalną inhibicję zarówno ecetylo- jak i butyrylocholinoesterazy. Jednakże, ze względu na wysoką hepatotoksyczność została wycofana z użycia. Nieskomplikowana struktura cząsteczki takryny oraz wysoka biodostępność czyni ją nadal obiecującą strukturą do dalszych modyfikacji i poszukiwania nowych związków pozbawionych silnych działań niepożądanych.



Znacząca rola stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego leżącego u podstaw rozwoju zmian neurodegeneracyjnych przyczyniła się do rozpoczęcia badań nad przydatnością związków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Wykazano, iż leki z grupy NLPZ dają pozytywne efekty zarówno w prewencji rozwoju choroby jak i łagodzeniu skutków w późniejszych fazach jej rozwoju. Wyniki przeprowadzonych badań z użyciem indometacyny wykazały i/ spowolnienie postępu choroby, ii/ poprawę zdolności poznawczych, iii/ niższą neurotoksyczność indukowaną przez amyloid- $\beta$ . Biorąc pod uwagę wielokierunkowy charakter patofizjologii choroby Alzheimerera, najbardziej racjonalne wydaje się zastosowanie terapii skojarzonej opartej na jednoczesnym zastosowaniu kilku leków z różnych grup terapeutycznych. Alternatywnym rozwiązaniem dla wprowadzenia terapii skojarzonej jest poszukiwanie leków wielofunkcyjnych o działaniu wielokierunkowym na drodze procesu hybrydyzacji. Tworzenie hybryd poza zwiększeniem efektywności leczenia ma na celu ograniczenie możliwych interakcji pomiędzy lekami oraz uproszczenie schematu dawkowania co warunkuje bezpieczeństwo i skuteczność farmakoterapii.

Uzasadnionym zatem celem badań, przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr farm. Kamila Zawady, było zaprojektowanie i otrzymanie nowej serii hybryd o strukturze złożonej z farmakoforów o aktywności inhibicyjnej wobec cholinesteraz (acetylo- i butyrylocholinesterazy) oraz z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Do syntezy nowych hybryd wybrano takrynę - jako związek o udokumentowanej aktywności inhibicyjnej wobec cholinesteraz oraz indometacynę - jako komponentę przeciwzapalną.

Tytuł dysertacji Doktoranta został prawidłowo sformułowany i w pełni odzwierciedla cel badań. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za trafny, zgodny z kierunkiem współczesnych badań naukowych i aktualnym stanem wiedzy. Podejmowany problem uważam za uzasadniony, niezwykle ważny zarówno: i/ z punktu widzenia naukowego (w tym rozwoju chemii medycznej), ii/ znaczenia medycznego oraz iii/ społecznego, z uwagi na fakt iż obecnie stosowane metody leczenia choroby Alzheimerera tylko spowalniają postęp choroby.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 117 stron tekstu wraz z piśmiennictwem. Tekst pracy zawiera typowe dla opracowań naukowych rozdziały, z zachowaniem właściwych proporcji. Dodatkowo w pracy zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w tekście pracy, co bardzo ułatwia ocenę dysertacji.

We Wstępie Doktorant w oparciu o obszernie piśmiennictwo przedstawił aktualną wiedzę z zakresu charakterystyki choroby Alzheimerera - w tym hipotezy rozwoju choroby jak i rolę przewlekłego stanu zapalnego w komórkowym i molekularnym mechanizmie rozwoju choroby. W kolejnych podrozdziałach scharakteryzował obecnie stosowane leki w terapii choroby Alzheimerera wskazując na ważną rolę niesteroidowych leków przeciwzapalnych jako uzupełnienie farmakoterapii. Ostatni podrozdział tej części pracy Autor poświęcił charakterystyce nowych strategii leczenia ze szczególnym uwzględnieniem leków wielofunkcyjnych. Zagadnienia omówione na 43 stronach Wstępu zostały dodatkowo uzupełnione 9 rycinami oraz 5 schematami. W tym miejscu chciałbym wskazać, iż dla prezentowanych we Wstępie pracy wzorów chemicznych leków Doktorant nie podał odpowiednich odnośników literaturowych. Pomimo tej drobnej uwagi, omówione we Wstępie pracy zagadnienia świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktoranta do podjęcia badań, będących podstawą pracy doktorskiej, a także stanowią wprowadzenie do postawionego celu badań.

Przedstawiony przez mgr farm. Kamila Zawadę cykl badań stanowi starannie zaplanowany i dobrze przemyślany panel eksperymentalny umożliwiający analizę złożonej hipotezy badawczej.

Realizacja postawionego celu pracy wymagała od Doktoranta przeprowadzenia i/syntezy serii 8 nowych związków, w których I-rzędowa grupa aminowa przy atomie węgla C9 w cząsteczce takryny została podstawiona alifatyczną cząsteczką alkilodiaminy stanowiącą łącznik z cząsteczką indometacyny; ii/ analizy *in vitro* aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków wobec cholinioesteraz; iii/ badania kinetyki enzymatycznej; iv/ oceny przeżywalności komórek (HepG2, EA.hy926); v/ wyznaczenia punktu pKa dla wybranego, najbardziej aktywnego związku; vi/ badania aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS i DPPH oraz vii/ analizy *in silico* – z zastosowaniem modelowania molekularnego. Szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych został zamieszczony w rozdziale Metodologia Badań. Przedstawione metody są co do zasady aktualne i adekwatne do rozwiązywanych problemów naukowych i w zdecydowanej większości nie budzą żadnych wątpliwości. Pojawiło się jednak kilka zagadnień, które w mojej opinii wymagają wyjaśnienia lub przedyskutowania:

i/ co stanowiło kryterium wyboru dla zastosowanych w badaniach linii komórkowych – proszę o przedyskutowanie dlaczego nie zastosowano linii komórkowych hepatocytów prawidłowych.

ii/ ocena przeżywalności, aktywności metabolicznej, w zależności od zastosowanej linii komórkowej, została przeprowadzona z wykorzystaniem dwóch różnych testów – proszę o podanie przyczyny zastosowania testu CellTiter Proliferatior Assay w przypadku komórek linii HepG2 oraz testu MTT w przypadku komórek EA.hy926.

iii/ w pracy doktorskiej mało miejsca poświęcono analizie statystycznej otrzymanych wyników. Moim zdaniem warto rozważyć przeprowadzenie bardziej rozbudowanej analizy statystycznej, co w wyraźny sposób wzbogaci wnioski formułowane na podstawie otrzymanych wyników badań.

Sformułowanie powyższych pytań wynika jedynie z przywileju recenzenta, z którego skorzystałem i w żadnym wypadku nie ma charakteru uwag krytycznych. Powyższe pytania mogą natomiast stanowić wskazówki w kierunku doskonalenia warsztatu badawczego oraz interesujący przedmiot dyskusji na polu naukowo-akademickim.

Uzyskane wyniki badań zostały zredagowane na 18 stronach pracy w rozdziale „Wyniki i Dyskusja” oraz udokumentowane szczegółowo w 5 tabelach zbiorczych. W tej części Autor dokonuje zasadniczego omówienia wyników jak i również wysuwa po każdym cyklu badań wnioski cząstkowe. Rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości zagadnienia oraz dobrym przygotowaniu do realizacji badań. W tym miejscu jednak chciałbym zapytać Doktoranta o wyniki badań prac innych autorów, w tym opisanych innych związków hybrydowych takryny.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie uzasadnionych wniosków, korespondujących z założonym celem pracy i wnoszących nowe istotne informacje do aktualnego stanu wiedzy. W mojej opinii najistotniejszymi efektami prowadzonych badań było wykazanie iż:

i/ sześć nowych nowo-zsyntetyzowanych związków wykazywało wyższą aktywność inhibicyjną wobec acetylocholinoesterazy niż takryna, a pięć wyższą aktywność niż donepezil.

ii/ dwa z przebadanych związków wykazywało wyższą aktywność inhibicyjną wobec butyrylocholinoesterazy niż takryna oraz wszystkie związki były aktywniejsze od donepezilu.

iii/ związek 3h wykazywał najwyższą aktywność inhibicyjną wobec acetylocholinoesterazy i posłużył do opracowania kinetyki reakcji inhibicji enzymu.

iv/ w badaniu wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek linii HepG2 oraz EA.hy926 nie zaobserwowano znaczącego wpływu na przeżywalność i aktywność metaboliczną analizowanych linii komórkowych.

v/ związek 3h wykazywał najwyższą aktywność antyoksydacyjną.

vi/ modelowanie molekularne wykazało obecność silnych oddziaływań związku 3h z aminokwasami wchodzącymi w skład CAS i PAS zarówno acetylo- i butyrylocholinoesterazy.

Cytowane przez Doktoranta 102 pozycje piśmiennictwa naukowego odzwierciedla rzetelnie stan wiedzy w obrębie omawianego tematu. Warto podkreślić, iż 65/102 pozycji, co stanowi około 60% wszystkich danych literaturowych - to doniesienia z ostatnich 10 lat, a spośród nich 25/65 pozycji (około 40%) to prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat, co wskazuje na dużą aktualność podjętego do oceny przez Doktoranta problemu naukowo-medyczno-społecznego. Rozprawa doktorska została zakończona Streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki są oryginalne i zaprezentowane w rzetelny sposób. Autor posługuje się fachowym słownictwem, co świadczy o dobrej orientacji w badanej dziedzinie. Treść pracy napisana jest starannie, zwięźle i utrzymana jest w logicznej sekwencji.

Z dużą satysfakcją pragnę podkreślić wartości poznawcze przedstawionych do oceny badań naukowych i ich znaczenie dla zrozumienia mechanizmów i możliwości leczenia chorób cywilizacyjnych jakimi są choroby neurodegeneracyjne. Potwierdzeniem wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej do recenzji dysertacji jest opublikowanie wyników badań, w formie oryginalnej pracy, w czasopiśmie posiadającym znaczący współczynnik oddziaływania Impact Factor (Chemical Papers, 2019 Impact Factor = 1,680) , w której Doktorant jest pierwszym autorem.

Reasumując wyrażam opinię, że przedstawiona do recenzji praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora, co w konsekwencji upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr farm. Kamila Zawadę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**PROFESOR SUM BADAWCZO-DYDAKTYCZNY**  
Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

*Artur Beberok*  
**dr hab. n. farm. Artur Beberok prof. SUM**