



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel.: 61 8546651
fax: 61 8546652
e-mail: ajelinsk@ump.edu.pl

Poznań, dnia 15 lutego 2021 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra farmacji Kamila Zawady
z tytułem

Innowacyjne hybrydy tetrahydroakrydyny z komponentem przeciwzapalnym,
wykonanej pod kierunkiem prof. dra hab. Pawła Szymańskiego
w Katedrze Chemii Farmaceutycznej
Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Choroba Alzheimera (AD) jest zaliczana do grupy chorób neurodegeneracyjnych. W okresie najbliższych 20-25 lat prognozuje się podwojenie liczby chorych cierpiących na AD. W ostatnim czasie wiedza o patofizjologii AD znacząco się poszerzyła, nadal jednak nie dysponujemy lekami pozwalającymi przerwać postęp choroby. Podstawowym celem leczenia AD jest polepszenie pamięci chorego lub spowolnienie szybkości utraty funkcji pamięciowych i poznawczych, a także jak najdłuższe utrzymywanie funkcjonowania chorego. Obecnie jedynym skutecznym leczeniem, które przynosi znaczące korzyści jest hamowanie aktywności cholinesteraz - acetylocholinoesterazy (AChE) i butyrylocholinoesterazy (BuChE). Do niedawna znaczenie BuChE było niedoceniane, mimo iż oba enzymy wpływają na regulację poziomu acetylocholinoesterazy i mogą mieć znaczenie w rozwoju choroby. Liczba leków z tej grupy dopuszczonych do stosowania jest ograniczona, stąd poszukiwanie nowych związków o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu AD, uważam za bardzo uzasadnione.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Po spisie treści i wykazie skrótów, Autor zamieścił obszerną część teoretyczną pracy, popartą przeglądem piśmiennictwa, głównie z ostatnich 10 lat. Część teoretyczna, licząca 50 stron, wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z charakterystyką choroby Alzheimera, danymi odnośnie zapadalności i prognozami w zakresie zachorowań. Bardzo szczegółowo zostały także opisane hipotezy rozwoju AD - cholinergiczna, amyloidowa i białka tau. Kolejny rozdział to podkreślenie znaczenia stanu zapalnego w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, który towarzyszy AD. Znaczna część tego rozdziału, co ma swoje uzasadnienie, została poświęcona możliwościom leczenia AD. W tej części pracy zostały szczegółowo przedstawione stosowane leki - inhibitory cholinesteraz i memantyna (antagonista receptorów NMDA) oraz niesteroidowe leki przeciwzapalne. Pragnę podkreślić, że ta część pracy została napisana przystępnym w odbiorze językiem, a odpowiednio dobrane i zastosowane w tekście piśmiennictwo specjalistyczne, w liczbie 102 pozycji, potwierdza jednoznacznie dokładne rozeznanie przez Doktoranta tematyki badawczej, którą przedstawia w niniejszej dysertacji.

Na dalszych stronach tekstu Autor zamieścił cel pracy, który zakładał zaprojektowanie i otrzymanie nowej serii hybryd o strukturze złożonej z farmakoforów o aktywności hamującej cholinesterazy (AChE i BChE) oraz o działaniu przeciwzapalnym, z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Do badań Doktorant wybrał takrynę i indometacynę. Takryna została wycofana z lecznictwa z uwagi na działanie hepatotoksyczne, ale także indometacyna nie jest pozbawiona licznych działań niepożądanych, związanych z niekorzystnym wpływem na przewód pokarmowy, ONU i układ krwiotwórczy.

Pan mgr Kamil Zawada wyznaczył 7 celów pracy, których realizacja jest podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora. Wśród wymienionych celów badawczych znajdują się: synteza 8 związków hybrydowych – połączenia takryny i indometacyny, różniących się liczbą grup $-CH_2-$ w łańcuchu alkiloaminowym, badania *in vitro* hamowania aktywności cholinesteraz, badania kinetyki reakcji enzymatycznej oraz wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek, wyznaczenie wartości pK_a , badanie aktywności antyoksydacyjnej oraz modelowanie molekularne.

Podjęcie przez Pana mgra Kamila Zawadę przedstawionego powyżej zadania badawczego uważam za zasadne, uwzględniając aspekt poznawczy i metodologiczny. Cel pracy został poprawnie określony i przedstawiony w sposób nie budzący wątpliwości.

Kolejny rozdział to Metodologia badań, w którym Autor w poszczególnych podrozdziałach podał stosowane odczynniki, aparaturę, a na kolejnych stronach szczegółowo przedstawił syntezę nowych związków oraz wszystkie wykonane badania. Opisane procedury oraz sposób przeprowadzenia eksperymentów potwierdzają dobre przygotowanie Doktoranta, a jednocześnie pozwalają na odtworzenie przeprowadzonych badań.

W rozdziale Wyniki i dyskusja, dla recenzenta chyba najważniejszym, bo pozwalającym na stwierdzenie czy Autor potrafi w sposób naukowy przedstawić uzyskane wyniki badań oraz odnieść je do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie, Doktorant opisał szczegółowo proces łączenia takryny z indometacyną oraz sposoby kontrolowania procesu i oczyszczania związków. W dalszym etapie Autor potwierdził struktury chemiczne otrzymanych związków, stosując nowoczesne metody spektroskopowe, takie jak IR, 1H -NMR i MS. Przedstawił także w tabeli wydajność reakcji, postać otrzymanego związku hybrydowego oraz temperaturę topnienia. Zaprezentowana analiza widm pozwala na potwierdzenie struktury otrzymanych związków, a jednocześnie dowodzi znajomości tych metod. W dalszej części Autor odniósł się do przeprowadzonych badań, które pozwoliły na wybranie związku o najlepszych parametrach w zakresie hamowania aktywności cholinesteraz, dla którego określono kinetykę reakcji hamowania acetylocholinesteraz. Z dużym zainteresowaniem zapoznałam się badaniami dotyczącymi wpływu otrzymanych przez Doktoranta związków na przeżywalność komórek. Do badań Autor wybrał linię komórkową HepG2 i EA.hy926. Tak zaplanowane badania pozwoliły na stwierdzenie, że związki hybrydowe będące połączeniem takryny i indometacyny przez łącznik alkilowy nie wykazują silnego działania hepatotoksycznego oraz działania toksycznego na śródbłonek naczyń. Możliwość zastosowania otrzymanych związków jako potencjalnych substancji leczniczych, Autor tłumaczy korzystnym indeksem terapeutycznym. Dalsze badania dotyczyły wyznaczenia wartości pK_a oraz aktywności antyoksydacyjnej metodą ABTS i DPPH. Te ostatnie pozwoliły na stwierdzenie, że otrzymany związek hybrydowy, oznaczony jako 3h, wykazuje właściwości antyoksydacyjne, które nie były stwierdzone dla związków wyjściowych, tj. takryny i indometacyny. Tak zaprojektowany związek, wykazujący zdolność hamowania aktywności cholinesteraz, a jednocześnie aktywność

antyoksydacyjną może znaleźć się w kręgu zainteresowań nowych substancji o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu AD. Jednakże, jak stwierdza Autor – należy przeprowadzić dalsze badania określające potencjał tego związku w zakresie hamowania agregacji β -amyloidu, co wpisywałoby się w próby leczenia przyczynowego AD. Ponadto, konieczne są badania potwierdzające skuteczność i bezpieczeństwo stosowania. Końcowy etap pracy stanowi modelowanie molekularne, które pozwoliło ustalić w jaki sposób otrzymane przez Doktoranta związki wiążą się acetylocholinoesterazą i butyrylocholinoesterazą. Wyniki badań zostały udokumentowane w postaci 11 tabel i 15 rycin.

Podsumowanie wyników badań Doktorant przedstawił w części zatytułowanej Wnioski, które w moim odczuciu nie są wnioskami, a stanowią streszczenie przeprowadzonych badań. Nie mniej jednak konkluzje zawarte w tej części są uzasadnione i poparte przeprowadzonymi badaniami oraz danymi z piśmiennictwa. Całość pracy dopełniają streszczenia w języku polskim i angielskim.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca opiera się na wynikach badań z zakresu projektowania, syntezy oraz analizy nowych substancji o działaniu hamującym aktywność cholinoesteraz oraz wykazujących działanie przeciwzapalne. Kompleksowość i interdyscyplinarność pracy dopełniają próby wyjaśnienia mechanizmu oddziaływania nowej substancji z wykorzystaniem modelowania molekularnego oraz badania wpływu otrzymanych związków na przeżywalność komórek.

W przedstawionej do oceny pracy, mimo korekty autorskiej, napotkałam na błędy edytorskie, takie jak: brak spacji pomiędzy wartościami liczbowymi i jednostkami; w kilku miejscach po przecinku rozpoczyna się z dużej litery nowe zdanie, np. str. 19 (14 w. dół), str. 21 (10 w. góra), str. 22 (7 w. dół); inne błędy to np. bufora – powinno być buforu (str. 79), napływ wapnia, str. 19, powinno być jonów wapnia, niepoprawne przypadki, np. str. 22, str. 80; niepoprawne sformułowania, np. zastąpienie I-rzędowej grupy aminowej w cząsteczce takryny (str. 61), raczej jest to podstawienie; mierzymy absorbancję (str. 75), co z kolei jest poprawnie użyte na kolejnych stronach pracy; w przypadku roztworów mówimy o ich objętości (str. 81); w badaniach przeżywalności mówimy o próbie kontrolnej a nie próbie ślepej (str. 79); str. 88 zależności odwróconej szybkości reakcji od odwróconego stężenia substratu, powinno być zależności odwrotności szybkości reakcji od odwrotności stężenia substratu; aspiryna to nazwa handlowa, zatem proponuję używanie nazwy kwas acetylosalicylowy; do selektywnych inhibitorów COX-2 nie zalicza się nimesulidu, jest on zaliczany do II generacji NLPZ, tzw. preferencyjnych względem COX-2 (str. 52), co słusznie zapisano na str. 49; koło (str. 30) powinno być około, str. 58 jest memochina, powinno być meflochina; używanie nazw z bezpośredniego tłumaczenia, kiedy mamy odpowiedniki np. zamiast dyferencjacji komórek – różnicowania komórek oraz drobne uchybienia w zakresie tłumaczenia nazwy chemicznej, np. str. 8 *N*-metyl-*D*-aspartate.

Proszę także o wyjaśnienie dlaczego w rozdziale 8.7 na str. 79 na płytce 96-dołkowej umieszczano komórki z zachowaniem gęstości 104 komórki/dołek.

Powyższe uwagi nie wpływają w żaden sposób na wysoką ocenę merytoryczną pracy. Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy zostały opublikowane w czasopiśmie *Chemical Papers*, jako praca wieloosrodkowa, co potwierdza aktualność tematyki badawczej oraz fakt, że zaplanowane badania zostały dobrze wykonane i zinterpretowane. Stanowiąca główny cel pracy synteza nowych związków hybrydowych została wzbogacona o badania fizykochemiczne, biologiczne i obliczeniowe, nadając pracy charakter interdyscyplinarności oraz wnosi nowe istotne

dane do prezentowanej tematyki badawczej. Wykonanie tak szerokiego zakresu różnorodnych badań wymagało zdolności organizatorskich i współpracy różnych zespołów badawczych. W tym miejscu chciałabym podkreślić, że realizacja pracy doktorskiej pod kierunkiem Pana prof. dra hab. Pawła Szymańskiego oraz praca w Jego zespole badawczym, o uznanej renomie międzynarodowej, niewątpliwie przyczyniła się do końcowego sukcesu.

Podsumowując, pozytywnie oceniam pracę doktorską Pana mgra Kamila Zawady i jednoznacznie potwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymagania formalne stawiane pracom doktorskim. Z związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana mgra Kamila Zawady do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK

Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej

A. Jelińska

Prof. zw. dr hab. n. farm. Anna Jelińska