



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY

Warszawa, 05.06.2023 r.

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr farm. Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej
pt. „ Ocena nowych hybryd akrydyny w kierunku poszukiwania ligandów
wielofunkcyjnych”**

wykonanej pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. n. farm. Pawła Szymańskiego w
Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy leku i Radiofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Podstawę opracowania recenzji stanowiło pismo Przewodniczącej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi – prof. dr hab. n. med. Anny Kilianowicz-Sapoty z dnia 26.04.2023 r. oraz przekazana rozprawa doktorska.

Praca doktorska mgr Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej została przygotowana w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji wchodzącym w skład Katedry Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Tematyka pracy dotyczyła zaprojektowania oraz syntezy pochodnych, hybryd kwasu 9-akrydynokarboksylowego oraz cyklopentachinoliny połączonych za pomocą łańcucha alifatycznego o różnej długości w postaci wolnej zasady oraz soli w aspekcie poszukiwania nowych hybryd akrydyny jako ligandów wielofunkcyjnych. Niniejsza praca doktorska obejmuje syntezę ośmiu nowych pochodnych akrydyny oraz cyklopentachinoliny jako potencjalnych inhibitorów acetylocholinoesterazy, które mogłyby być w przyszłości wykorzystane w leczeniu objawowym demencji i choroby Alzheimerera. Akrydyny należą do grupy policyklicznych związków heteroaromatycznych. Ich struktura chemiczna wywodzi się z trójpierścieniowego związku aromatycznego, będącego analogiem antracenu zawierającego atom azotu w pierścieniu B. Związki te powszechnie stosowane są m. in. jako leki przeciwnowotworowe (np. amsakryna). Jednak ze względu na działania niepożądane i ich toksyczność wciąż poszukuje się nowych analogów o lepszym profilu farmakologicznym. Ponadto akrydyna i jej pochodne wykazują wielokierunkową aktywność biologiczną związaną z działaniem przeciwbakteryjnym, przeciwmalarycznym, przeciwgrzybiczym, przeciwwirusowym, przeciworobaczym i przeciwzapalnym w szerokim tego słowa znaczeniu. Z kolei Chinolina będąca benzo[b]pirydyną jest związkiem heterocyklicznym zawierającym



atom azotu. Jako III-rzędowa amina tworzy sole z kwasami i ulega podstawieniu zarówno nukleofilowemu jak i elektrofilowemu. Pochodne chinoliny również wykazują wielokierunkowe działanie biologiczne. Są stosowane jako środki przeciwmalaryczne (chinina, chlorochina, meflochina, promachina), przeciwbakteryjne (cyprofloksacyna), przeciwgrzybicze (kliochinol) i przeciwgruźlicze (bedakilina). Również w terapii przeciwnowotworowej takie substancje lecznicze jak kamptotecyna oraz topotekan i irynotekan zawierają w swojej cząsteczce strukturę chinoliny. Cyklopentachinolina o strukturze analogicznej do tetrahydroakrydyny badana jest również jako związek potencjalnie aktywny wobec cholinoesteraz. Poszukiwanie związków aktywnie czynnych w chorobach neurodegeneracyjnych stanowi aktualnie duże wyzwanie zwłaszcza w aspekcie nieuleczalności takich jednostek chorobowych jak choroba Parkinsona, choroba Alzheimerera, czy też choroby demielinizacyjne. Historycznie, pierwszym lekiem, który został zarejestrowany i zastosowany w leczeniu choroby Alzheimerera była takryna będąca pochodną akrydyny. Jako inhibitor cholinoesteraz nie leczy ona przyczyny choroby, lecz jedynie jej skutek. Jednak leczenie objawowe poprawia jakość życia pacjenta. Niestety terapia może się również wiązać z szeregiem działań niepożądanych wywieranych przez lek. Dlatego podejmuje się działania w kierunku tworzenia leków wielofunkcyjnych (hybrydowych), które w nomenklaturze anglosaskiej noszą nazwę multi-target directed ligands (MTDL's) mogących znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób o wieloczynnikowym i złożonym patomechanizmie z równocześnie ograniczonymi do minimum działaniami niepożądanymi.

Cele pracy doktorskiej mgr Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej obejmowały syntezę ośmiu pochodnych hybryd kwasu 9-akrydynokarboksyłowego oraz cyklopentachinoliny, oczyszczenie produktów za pomocą technik chromatograficznych oraz potwierdzenie ich struktur przy użyciu metod spektroskopowych, ocenę aktywności biologicznej *in vitro* i antyoksydacyjnej, zbadanie kinetyki działania inhibicyjnego, ocenę cytotoksyczności na linii ludzkich komórek oraz w końcowej części badań analizę otrzymanych produktów z zastosowaniem modelowania molekularnego i określenie właściwości fizykochemicznych wybranych związków w trakcie symulacji komputerowej procesów ADMET.

Praca liczy 117 stron. Zawiera wykaz stosowanych skrótów oraz część teoretyczną i część praktyczną pracy. Część teoretyczna obejmuje wstęp, wydzielone rozdziały dotyczące patogenezy i farmakoterapii choroby Alzheimerera oraz charakterystyki fizyko-chemicznej i



opisu wielokierunkowego mechanizmu działania pochodnych akrydyny i chinoliny. Z zamieszczonych w rozdziałach informacji jasno wynikają założenia prezentowanej pracy i jej cele szczegółowe. Część teoretyczna jest napisana czytelnie z dużą starannością dotyczącą omawianych zagadnień. Całość jest spójna i zrozumiała. Cele pracy sformułowano jasno i precyzyjnie. Z punktu widzenia wiedzy dotyczącej przyczynowości rozwoju choroby Alzheimera w organizmie człowieka i jej leczenia cennym wydaje się być zebranie informacji dotyczących współcześnie stosowanych leków oraz najnowszych schematów terapeutycznych. Wartościowym uzupełnieniem stał się również przegląd jednostek chorobowych w których terapii znalazły zastosowanie pochodne akrydyny i chinoliny.

W części praktycznej Autorka opisała zastosowaną metodologię badań z opisem przeprowadzonych syntez w formule „step by step”. Kolejno przedstawiono w pracy badania biologiczne. W rozdziale zostało omówione szczegółowo przygotowanie odczynników do badań, ocena aktywności inhibicyjnej wobec cholinoesteraz *in vitro* zsyntetyzowanych związków, ocena aktywności antyoksydacyjnej i badania hepatotoksyczności. Rozdział dotyczący badań biologicznych zakończono krótkim omówieniem oprogramowania komputerowego zastosowanego w modelowaniu molekularnym i analizie ADMET.

Rozdział wyniki i dyskusja zawiera schematy wykonanych syntez, również tych, w wyniku których otrzymano substrat do dalszych etapów prowadzonej reakcji. Wynikiem pracy syntetycznej stało się otrzymanie ośmiu nowych, wcześniej nigdzie nie opublikowanych związków zgodnie z posiadaną najlepszą wiedzą przez Doktorantkę. Produkty syntezy oraz produkt końcowy został oczyszczony za pomocą chromatografii typu „Flash”. Zamieszczono również stabelaryzowane wyniki badań strukturalnych związków przeprowadzonych z użyciem metod spektroskopowych m. in. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR-ATR, MS-ESI. Wykonane w dalszej części badania dotyczące aktywności inhibicyjnej związków wobec AChE i BuChE, charakterystyki kinetyki reakcji enzymatycznej AChE i BuChE i właściwości antyoksydacyjnych wybranych związków o najwyższej aktywności nie budzą jakichkolwiek zastrzeżeń. Badania dotyczące modelowania molekularnego zostały opisane w wyczerpujący sposób. W końcowej części omawianych wyników przedstawiono w sposób bardzo syntetyczny wyniki analizy ADMET.

Analizując przedstawione wnioski wynikające z przeprowadzonych badań należy podkreślić wymierne osiągnięcia Doktorantki, a mianowicie:



- Większość związków osiągnęła wartość IC_{50} o wartościach nanomolowych
- Otrzymane cząsteczki wykazywały wyższą aktywności wobec BuChE
- Najwyższą aktywność inhibicyjną wobec AChE wykazała pochodna posiadająca siedem grup metylenowych w łańcuchu alkilowym podczas gdy w stosunku do BuChE najaktywniejszym związkiem była pochodna zawierająca trzy grupy metylenowe w łączniku alkilowym między strukturą cyklopentachinoliny i kwasu 9-akrydynokarboksylowego
- Wykonane badanie hepatotoksyczności związku o najwyższej aktywności inhibicyjnej potwierdzają jego słabszą hepatotoksyczność w stosunku do związku o krótkim łańcuchu alkilowym.
- W trakcie analizy komputerowej podczas modelowania molekularnego interakcje związków z enzymami okazały się być zależne od długości łańcucha alkilowego, rodzaju reszt aminokwasowych budujących wejście oraz wnętrza miejsca aktywnego enzymów, obecności wiązań wodorowych oraz ustawienia względem siebie dwóch katalitycznych grup.
- Analiza komputerowa ADMET jednoznacznie potwierdziła optymalne właściwości farmakokinetyczne i aktywność inhibicyjną jednego z otrzymanych związków (3b), którego dalsze badania powinno być kontynuowane w celu określenia wpływu na inne patomechanizmy towarzyszące chorobie Alzheimera.

Piśmiennictwo załączone do pracy obejmuje aż 188 pozycji. Chciałbym przy tym podkreślić, że Pani Magister niewątpliwie włożyła dużo pracy, aby przeanalizować tak dużą liczbę publikacji i odnieść ją do własnych wyników.

W tym miejscu chciałbym umieścić kilka uwag edytorskich i zadać Doktorantce pytania, które mogłyby stać się przedmiotem krótkiej dyskusji podczas obrony pracy:

Uwagi edytorskie

- w pracy nie zamieszczono spisu rycin i tabel, których liczba przekracza kilkanaście. Wydaje mi się, że dużym ułatwieniem dla czytelnika byłoby zamieszczenie takiego spisu,



- według mnie lepszym rozwiązaniem byłoby zamieszczenie schematów syntez w rozdziale dotyczącym metodyki badań zamiast jak to uczyniono w wynikach i dyskusji. Wówczas stanowiłoby to spójną całość,
- opis wyników analizy ADMET zamieszczony na jednej stronie pozostawia pewien niedosyt związany z bardziej szczegółowym opisem przeprowadzonej analizy mającej określić profil fizykochemiczny badanych związków,
- wymaga wyjaśnienia również kwestia samodzielnej pracy Doktorantki na poszczególnych etapach pracy badawczej i Jej współdziałaniu w wykonywaniu poszczególnych analiz. Zawarta w pracy informacja (patrz: wyniki i dyskusja) dotycząca wykorzystania substratu do syntezy otrzymanego wcześniej w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji potwierdza przypuszczenie, że niektóre czynności związane z pracą badawczą były wykonywane również przy współdziałaniu innych pracowników naukowych.

Pytania

- jakie są dalsze plany wobec cząsteczki o potwierdzonej wysokiej aktywności inhibicyjnej w kontekście poszukiwania kolejnych kandydatów na leki skuteczne w chorobie Alzheimerera
- jakie byłyby zdaniem Doktorantki optymalne właściwości fizykochemiczne dla badanych związków w tej grupie leków klasyfikowanej według systemu anatomiczno-terapeutyczno-chemicznego (ATC)
- jakie znaczenie wiąże Doktorantka z rozwojem metod diagnostycznych (obrazowania oraz bardziej inwazyjnego pobierania materiału biologicznego) w celu wczesnego prognozowania zagrożeń związanych z możliwością pojawienia się objawów towarzyszących chorobie Alzheimerera
- czy leczenie przyczynowe może w przyszłości wyeliminować leczenie objawowe w chorobach neurodegeneracyjnych, co stałoby się przyczyną zaprzestania poszukiwań nowych inhibitorów AChE i BChE.

Pragnę zaznaczyć, że powyższe uwagi dotyczące pracy w żadnym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji ani kluczowej roli jaką odegrała Pani Magister w realizacji założonych celów badawczych. Świadczą jedynie o niedoskonałości nawet najlepiej zaprojektowanych i realizowanych projektów naukowych.



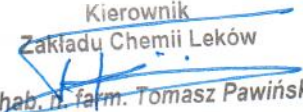
WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej posiadają wysoką wartość merytoryczną i zawierają niewątpliwie element nowości. Została przyjęta poprawna metodyka badawcza i przeprowadzono właściwą analizę wyników. Doktorantka podczas prowadzenia pracy badawczej wykazała szereg umiejętności w zakresie rozwiązywania zróżnicowanych problemów naukowych. Całość pracy doktorskiej potwierdza wiedzę teoretyczną Kandydatki w dziedzinie naukowej będącej przedmiotem badań. Podkreślona przez Nią konieczność prowadzenia dalszych badań w celu wyjaśnienia do głębi mechanizmów działania otrzymanych związków świadczy o kreatywnym podejściu do oczekiwanych dalszych celów pracy badawczej.

Uważam zatem, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej spełnia warunki określone w art. 187 ust.1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1669). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Zakładu Chemii Leków

Dr hab. n. farm. Tomasz Pawiński