



**Dr hab. n. farm. Maciej Stawny**

**RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej**

**Pani mgr farm. Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej**

**pt. *Ocena nowych hybryd akrydyny w kierunku poszukiwania ligandów wielofunkcyjnych***

**wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Pawła Szymańskiego**

**oraz promotora pomocniczego dr Kamili Czarneckiej**

**w Katedrze Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej ma postać maszynopisu w klasycznej dla tego typu opracowań strukturze. Na 117 stronach Doktorantka przedstawiła zagadnienia teoretyczne, metodyczne, uzyskane wyniki i ich dyskusję, wnioski wynikające z przeprowadzonych badań, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury.

Część teoretyczna stanowi znakomite wprowadzenie do tematyki prowadzonych badań i świadczy o rzetelnym przygotowaniu się Doktorantki do zaplanowania części doświadczalnej. W teoretycznym wprowadzeniu przedstawione zostały aktualne informacje nt. choroby Alzheimera, czynniki ryzyka predysponujące do jej wystąpienia oraz szczegółowo omówiono współczesne metody diagnostyki tej choroby. Następnie Doktorantka opisała zagadnienia związane z hipotezami rozwoju choroby Alzheimera w oparciu o różne zmiany patologiczne. W tej części pracy znajduje się aktualny stan wiedzy na temat hipotezy cholinergicznej, hipotezy kaskady  $\beta$ -amyloidu oraz hipotezy związanej z białkiem tau. Autorka szczegółowo przedstawiła rolę i znaczenie w chorobie Alzheimera dwóch esteraz – acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy, które wykorzystała później do potwierdzenia aktywności otrzymanych w toku badań związków. Doktorantka opisała również historyczne i aktualne metody farmakologicznego leczenia choroby Alzheimera. Ostatni rozdział części teoretycznej



ocenianego doktoratu poświęcony jest właściwościom fizykochemicznym, strukturalnym oraz biologicznym związków pochodnych akrydyny i chinoliny. Autorka opisała funkcjonujące od lat w lecznictwie pochodne akrydyny, które wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwpierwotniakowe, przeciwmalaryczne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe, przeciwoznaczające, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne oraz jako inhibitory AChE. Podobną analizę Doktorantka przeprowadziła dla leków zawierających w swojej strukturze fragment chinoliny, stwierdzając m.in., że chinolina oraz jej pochodna cyklopentachinolina, której budowa jest analogiczna ze strukturą tetrahydroakrydyny jest aktywnie badana jako potencjalny inhibitor cholinoesteraz o możliwych pożądanym efektach w terapii choroby Alzheimera.

Ostatni rozdział części teoretycznej znakomicie łączy się z dalszą częścią rozprawy doktorskiej, w której Doktorantka opisuje cel i przedmiot podjętych badań. Jak wskazano, celem ocenianej dysertacji było zaprojektowanie oraz zbadanie serii nowych pochodnych kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinoliny jako związków o wielokierunkowym mechanizmie działania i potencjalnym wykorzystaniu w terapii choroby Alzheimera. Struktura związków bazowała na układach akrydyny i chinoliny o potwierdzonej, wielokierunkowej aktywności biologicznej wobec cholinoesteraz.

Pani mgr Karolina Maciejewska-Stupska zrealizowała założony cel swoich badań w kilku etapach. Po pierwsze musiała zaprojektować oraz przeprowadzić syntezę nowych hybryd pochodnych kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinoliny. W konsekwencji tych działań Doktorantka otrzymała osiem związków w postaci wolnej zasady oraz chlorowodorków, różniących się długością, łączącego oba ugrupowania, łańcucha alifatycznego. Nieodzownym elementem prac syntetycznych jest konieczność oczyszczania otrzymanych związków oraz potwierdzenie ich struktury. Ten etap pracy badawczej Doktorantka przeprowadziła z zastosowaniem metod chromatograficznych (oczyszczanie) oraz spektralnych (potwierdzenie tożsamości). Wykorzystała takie metody analityczne jak: spektroskopię w podczerwieni, protonowy i węglowy rezonans magnetyczny oraz spektrometrię mas. Na tym etapie badań istotne wydawałoby się określenie czystości chemicznej otrzymanych struktur i profilu ich



zanieczyszczeń za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, zwłaszcza, że otrzymane związki poddawano dalszym badaniom, w tym biologicznym. Pozostawiam tą kwestię do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej.

W kolejnych etapach badań mgr Maciejewska-Stupska skupiła swoje prace badawcze na ocenie aktywności inhibicyjnej zsyntetyzowanych związków wobec cholinoesteraz. Wykazano, że otrzymane struktury odznaczały się wysoką aktywnością inhibicyjną wobec użytych enzymów, z większą selektywnością wobec butyrylocholinoesterazy niż acetylocholinoesterazy. Badania kinetyki reakcji enzymatycznej cholinoesteraz przeprowadzono natomiast tylko dla dwóch otrzymanych związków, które wykazywały najwyższą aktywność wobec użytych enzymów. Wykazano mieszany typ inhibicji oraz stwierdzono, że otrzymany kompleks substrat-enzym-inhibitor posiadał zmniejszoną aktywność katalityczną. Biorąc pod uwagę różnice w aktywności inhibicji wobec zastosowanych cholinoesteraz można spodziewać się różnic w parametrach kinetycznych reakcji enzymatycznych dla poszczególnych związków. Do dyskusji pozostawiam kwestię, czy te parametry kinetyczne mogą różnić się istotnie dla pozostałych uzyskanych hybryd?

Doktorantka przeprowadziła również badania związane z oceną aktywności antyoksydacyjnej, wyznaczając pojemność antyoksydacyjną otrzymanych związków, czyli ich zdolność do pochłaniania reaktywnych form tlenu. Ze względu na potencjalne działanie hepatotoksyczne badanych pochodnych kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinolin, Doktorantka przeprowadziła badania cytotoksyczności na linii ludzkich komórek gwiaździstych wątroby za pomocą testu MTT. Obu tym badaniom również poddano tylko dwa otrzymane związki, które wykazywały najwyższą aktywność wobec użytych cholinoesteraz. Czy Doktorantka wykonywała badania dodatkowe, które nie są przedstawione w ocenianym maszynopisie, dla innych otrzymanych hybryd? Czy można spodziewać się zależności pomiędzy strukturą otrzymanych związków a ich aktywnością antyoksydacyjną oraz właściwościami hepatotoksycznymi?



W dwóch ostatnich etapach badań, mgr Maciejewska-Stupska przeprowadziła modelowanie molekularne obejmujące określenie miejsca wiązania badanych pochodnych z acetylocholinoesterazą oraz butyrylocholinoesterazą wraz z identyfikacją reszt aminokwasowych enzymu zaangażowanych w oddziaływanie z badanymi związkami oraz określiła parametry farmakokinetyczne i toksykologiczne za pomocą komputerowych symulacji procesów ADMET. Badaniom *in silico* poddano wszystkie otrzymane hybrydy, wykazując różnice we wzajemnym oddziaływaniu liganda względem enzymu oraz w profilach farmakokinetycznych dla poszczególnych badanych związków. Ten wniosek wskazuje, że zasadne byłoby przeprowadzenie wszystkich badań (kinetykę reakcji enzymatycznych, określenie właściwości antyoksydacyjnych i cytotoksycznych) dla wszystkich, a nie tylko dla wybranych, nowych hybryd pochodnych kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinoliny.

Przedstawione w ocenianym maszynopisie wyniki zostały opublikowane w 2022 roku w wieloautorskiej pracy: Maciejewska K, Czarnecka K, Kręcisz P, Niedziałek D, Wieczorek G, Skibiński R, Szymański P. Novel Cyclopentaquinoline and Acridine Analogs as Multifunctional, Potent Drug Candidates in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 May 24;23(11):5876 (doi: 10.3390/ijms23115876). Z dołączonych (w trybie uzupełnienia) do dokumentacji oświadczeń współautorów wynika jednoznacznie wiodąca rola Doktorantki w przeprowadzonych badaniach.

Praca doktorska mgr farm. Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej wnosi elementy nowości naukowej. Doktorantka poprawnie zaplanowała i przeprowadziła badania, zinterpretowała wyniki oraz wyciągnęła odpowiednie wnioski. Otrzymane przez Doktorantkę nowe hybrydy pochodne kwasu akrydynowego oraz cyklopentachinoliny wykazują aktywność biologiczną, a dalsze badania pozwolą określić ich przydatność w terapii choroby Alzheimera.

Mając na uwadze aktualność, novum oraz oryginalność rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej pt. *Ocena nowych hybryd akrydyny w kierunku poszukiwania ligandów wielofunkcyjnych*, stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, określonym w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel. 061 854 66 47  
fax 061 854 66 51  
e-mail: mstawny@ump.edu.pl

2018 poz. 1668 ) i tym samym wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr farm. Karoliny Maciejewskiej-Stupskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Poznań, dn. 11 lipca 2023 r.

