GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
ul. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
tel./fax 58 349 16 35
Kierownik: prof. dr hab. **Tomasz Bączek**
e-mail: tbaczek@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2016-10-31

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr. Damiana SZCZESNEGO

pt.:

Oznaczanie fizykochemicznych i biochemicznych właściwości naturalnych alkaloidów pirydynowych i piperydynowych oraz ich prostych pochodnych, istotnych dla działania przeciwko chorobie Alzheimera

wykonanej w

Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem

prof. dr. hab. dr hc Romana Kaliszana, czł. PAN i PAU

Odkrywanie nowych leków jest procesem złożonym i wieloetapowym. Proces ten rozpoczyna się jednak zawsze od identyfikacji punktu uchwytu dla potencjalnego leku i jest to zwykle białko (takim białkiem, które jest szczególnym przedmiotem zainteresowania przedłożonej pracy doktorskiej jest β-amyloid). Dopiero potem następuje walidacja punktu uchwytu z wykorzystaniem modelu zwierzęcego lub kultury tkankowej, zaprojektowanie odpowiedniego układu skriningowego dla związków małocząsteczkowych modulujących aktywność białka, charakterystyka i optymalizacja tych związków małocząsteczkowych, testowanie ich efektywności i toksyczności i ostatecznie przeprowadzenie badań klinicznych. Praca doktorska wpisuje się w ten tryb postępowania, proponując poznanie właściwości trygoneliny i jej analogów strukturalnych z punktu widzenia zapobiegania i leczenia choroby Alzheimera.

Zintegrowane studia biomedyczne obejmujące bioanalizę szerokiego spektrum analitów wraz z pogłębioną analizę statystyczną i chemometryczną stanowią przy tym nieodzowny element nowoczesnego prowadzenia badań. Dlatego obecnie, ogólna strategia zakłada coraz częściej łączne wykorzystanie nowoczesnych strategii bioanalitycznych, także podczas analizy farmakokinetycznej z użyciem nowych platform analitycznych. Chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (ang. *hydrophilic interaction liquid chromatography*, HILIC) może być przy tym cenną alternatywą dla chromatografii w odwróconym układzie faz (ang. *reversed-phase liquid chromatography*, RP-LC) w przypadku rozdzielania próbek zawierających związki o charakterze polarnym. To również zademonstrowano w pracy doktorskiej podczas oceny penetracji trygoneliny do ośrodkowego układy nerwowego. Ponieważ selektywność rozdzielania w HILIC jest cennymi uzupełnieniem chromatografii w odwróconym układzie faz, kombinacje HILIC, RP-LC, chromatografii jonowymiennej i innych układów rozdzielczych są obecnie niezwykle atrakcyjne dla zastosowania ich w najnowocześniejszych, analitycznych i bioanalitycznych, ortogonalnych układach chromatograficznych. Wzrastającą rolę HILIC widać także na przykładzie przedstawionej pracy doktorskiej.

Niezależnie od charakteru prowadzonych badań, kluczową role odgrywają odpowiednie, nowe techniki analityczne. Analizy takie prowadzone są w ośrodkach naukowych o uznanej renomie naukowej, dysponującymi nie tylko odpowiednim sprzętem kontrolno-pomiarowym, ale również doświadczeniem i wiedzą. I w tym też kontekście należy rozpatrywać program badawczy wywodzący się ze szkoły naukowej Pana prof. dr. hab. Romana Kaliszana, realizowany przez Pana mgr. Damiana Szczesnego. Problematyka, której podjął się Doktorant należy do trudnych z punktu widzenia opanowania warsztatu badawczego. Stanowi ona ponadto przedmiot studiów krajowych i międzynarodowych laboratoriów badawczych. Tego typu badania należą do tych, które wymagają zaistnienia umiejętności łączenia osiągnięć teoretycznych z praktyką. Stąd, na szczególne wyróżnienie zasługuje próba znalezienia stosownego kompromisu i wyciągnięcia odpowiednich wniosków na podstawie przedstawionych wyników pracy. Słowa uznania należą się za trafne sformułowanie tematu rozprawy, jak również konsekwentną jego realizację.

Całość rozprawy doktorskiej liczy 106 stron maszynopisu, dokumentowanego rysunkami (w liczbie 11), tabelami (w liczbie 11) i pozycjami literaturowymi (w liczbie 168). Analizując piśmiennictwo należy stwierdzić, że zdecydowana większość pozycji pochodzi już

z XXI wieku, obejmując najnowsze monografie książkowe oraz publikacje oryginalne. Układ pracy składa się typowo z części teoretycznej, celu pracy, części doświadczanej, wyników badań i dyskusji oraz wniosków. Ze względu na układ i przejrzystość niniejsze opracowanie jest jak najbardziej odpowiednie. Przedstawione rozważania w części teoretycznej to przede wszystkim obraz kliniczny i diagnostyka choroby Alzheimera, ze szczególnym uwzględnieniem biomarkerów choroby Alzheimera. Dalej, Autor poświęca dużo uwagi przedstawieniu czynników ryzyka i patofizjologii choroby Alzheimera, koncentrując się przy tym na przedmiocie szczególnego zainteresowania badawczego, czyli roli β-amyloidu wraz ze streszczeniem aktualnych teorii tłumaczących rozwój tej choroby. Dodatkowo, w sposób przejrzysty omówiono farmakoterapię choroby Alzheimera, biorąc pod uwagę nie tylko obecnie stosowane leki, ale także rozpatrując strategie eksperymentalne i omawiając znaczenie alkaloidów pirydynowych i piperydynowych będących przedmiotem szczególnego zainteresowania. Generalnie, należy stwierdzić, że ta część rozprawy jest dobrze napisana, w sposób jasny i nie budzący zastrzeżeń merytorycznych. Świetnie wprowadza czytelnika do dalszych rozdziałów niniejszej lektury. Wybór i wstępne uzasadnienie tematu badań przedstawiono właściwie w celu pracy, a w części eksperymentalnej Doktorant precyzyjnie opisał metodykę i warunki przeprowadzonych doświadczeń, zastosowane techniki pomiarowe oraz wykaz odczynników i materiałów zastosowanych w badaniach. W tym miejscu należy podkreślić trafność zarówno wyboru użytych technik i narzędzi obliczeniowych, dzięki którym, według mojej opinii, wytyczony przez Promotora i Doktoranta cel został osiągnięty. Za najważniejsze osiągnięcia Doktoranta należy uznać:

1) wykazanie, w wyniku przeprowadzonego modelowania molekularnego, że trygonelina i jej analogi mogą wchodzić w interakcje z resztami aminokwasowymi uznanymi za kluczowe w procesie agregacji β-amyloidu,
2) wykazania, że trygonelina i jej analogi nie wykazują cytotoksyczności (z wyjątkiem jednego badanego związku chemicznego) wobec linii komórkowej ludzkiego nowotworu neuroblastomy SH-SY5Y,
3) opracowanie procedury analitycznej opartej na technice HILIC-ESI-MS umożliwiającej określenie poziomu trygoneliny w surowicy krwi mysiej i tkance mózgowej myszy,
4) przeprowadzenie analizy farmakokinetycznej dla trygoneliny wraz z oceną jej przechodzenia przez barierę krew-mózg i szybkością eliminacji z organizmu.

Na podstawie przedstawionej rozprawy można zgodzić się z końcowym stwierdzeniem, że opisane eksperymenty wskazują na istniejący potencjał zawarty w strukturze trygoneliny pod kątem powinowactwa do β-amyloidu przy jednoczesnym uwzględnieniu konieczności poprawy istotnych dla procesów eliminacyjnych parametrów farmakokinetycznych.

Jak w każdej recenzowanej pracy doszukać się można punktów, które można poddać dyskusji. Wywiązując się z powierzonego obowiązku mam w związku z tym kilka uwag i zapytań.

1) Czy podczas przeprowadzanego dokowania molekularnego obserwowano w przypadku każdego badanego związku tak intensywne okupowanie rejonu β-amyloidu wyznaczonego przez wskazane w pracy reszty aminokwasowe? W tabeli 3 przedstawiono tylko wybrane wyniki dokowania w obrębie histydyny w pozycji 13 i 14.
2) Jakie były przesłanki merytoryczne użycia linii komórkowej ludzkiego nowotworu neuroblastomy SH-SY5Y podczas oceny cytotoksyczności badanych związków?
3) Wykresy zależności stężenia trygoneliny w surowicy (Rysunek 10) i w mózgu (Rysunek 11) nie informują precyzyjnie o odchyleniu standardowym obserwowanym dla zmierzonych wartości w każdym momencie czasu. Nie zebrano tych wyników również w tabelach umożliwiających bardziej szczegółową analizę danych cząstkowych.
4) Z jednej strony stwierdzono, że wyznaczony parametr logBB (logarytm stosunku stężeń trygoneliny w mózgu i krwi wynoszący -1,22 jest niższy niż spotykany u leków działających ośrodkowo (str. 83), a z drugiej strony, że jest tego samego rzędu wielkości, jak niektórych działających ośrodkowo leków (str. 88). W obu przypadkach podanie kilku przykładowych nazw leków mogłoby wzbogacić zawartą w pracy informację o charakterze porównawczym.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji zadań badawczych stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej zostały już częściowo wprowadzone do międzynarodowego obiegu informacji naukowej. Doktorant jest współautorem pięciu prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych umieszczonych na Liście Filadelfijskiej (*Chronobiology International*, *BMC Pharmacology and Toxicology*, *Pharmacology Reports*,

Journal of Chromatography B, Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics). To także świadczy na korzyść Doktoranta, bo prowadzone przez Niego badania stanowią część większego programu badawczego, realizowanego przez grupę naukowców cieszących się uznaniem w skali międzynarodowej. Takie doświadczenie to wartość podwyższająca jakość wykonywanych badań naukowych w naszym kraju.

Praca swoją tematyką i zakresem materiału badawczego zasługuje na uwagę. Została ona dobrze zaprojektowana i wykonana, odzwierciedlając przy tym duży wkład praca podczas zbierania i opracowania danych pomiarowych. Wyniki badań przedstawione w przejrzystej formie rycin i tabel zostały właściwie zinterpretowane. Wnioski zostały dobrze opisane, dowodząc również dobrego przygotowania teoretycznego Doktoranta oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Biorąc powyższe pod uwagę nie mam wątpliwości, że spełnione są wymogi formalne, aby Rada Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mogła podjąć uchwałę o dopuszczeniu Pana mgr. Damiana Szczesnego do ostatniego etapu postępowania kwalifikacyjnego, czyli publicznej obrony.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu
Chemii Farmaceutycznej

prof. dr hab. Tomasz Bączek