UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra i Zakład Chemii Leków
85-089 Bydgoszcz, ul. Dr A. Jurasza 2
+48 525853532; fax +48 525853529
e-mail: mmars@cm.umk.pl

Bydgoszcz, 14.11.2016 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Damiana Szczesnego

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

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. dr h.c. Romana Kaliszana, czł. PAN i PAU

w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Choroba Alzheimera należy do grupy chorób otępiennych i mimo faktu, iż po raz pierwszy została opisana przez niemieckiego neurologa Aloisa Alzheimera już ponad 100 lat temu, jej przyczyny wciąż nie są dokładnie poznane. Czy znalezione patologiczne białka, płytki beta-amyloidowe są przyczyną choroby, czy też powstają przy okazji zaburzeń stanowiących rzeczywistą przyczynę - na to pytanie odpowiedzi nie znamy. Na to pytanie również nie są w stanie odpowiedzieć Nobliści w dziedzinie Medycyny i Fizjologii z 2014 roku John O'Keefe, May-Britt Moser i Edvard Moser. Jednak prowadzone przez nich badania od ponad czterech dekad pozwoliły na odkrycie tzw. komórkowego systemu pozycjonowania znajdującego się w hipokampie, co jak twierdzą daje nowe możliwości walki z demencją.

Z uwagi na fakt, iż obecnie dostępne leki nie są w stanie zatrzymać postępu ani odwrócenia zmian w strukturach mózgu spowodowanych chorobą Alzheimera a jedynie złagodzenia objawów tej choroby, badania podejmowane w tym kierunku są pożądane i uzasadnione. Dlatego zaproponowany temat rozprawy doktorskiej przez Pana mgr Damiana Szczesnego dotyczący badań nad właściwościami naturalnych alkaloidów pirydynowych i

piperydynowych oraz ich pochodnych istotnych dla działania przeciwko chorobie Alzheimera jest niezwykle ważny i aktualny.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 106 stron i zawiera podstawowe rozdziały: streszczenie, część teoretyczną, cel pracy, metodykę, wyniki, dyskusję i wnioski oraz starannie dobrane piśmiennictwo. Praca poprzedzona jest wykazem skrótów a na końcu umieszczono spis tabel i rysunków co ułatwia lekturę rozprawy doktorskiej.

We wstępie doktorant obszernie opisał farmakoterapię choroby Alzheimera, zarówno pod kątem leków stosowanych jako spowalniające rozwój choroby jak również najważniejszych eksperymentalnych strategii leczenia tej choroby. W tej części wykazał się dużą wiedzą na temat najnowszych badań mających na celu identyfikację punktu uchwytu potencjalnego leku co mogłoby się przyczynić zarówno do zapobiegania przyczyny oraz leczenia choroby. Opisane badania eksperymentalne m. in. z zastosowaniem procesu immunizacji wobec fragmentu $A\beta_{1-42}$, inhibitorów białek szoku termicznego (głównie HSP90), agonistów receptora PPARγ czy też białko τ stanowią ciekawy kierunek w poszukiwaniu nowych leków. Jednak bez wątpienia najważniejszym punktem uchwytu jest β-amyloid.

Głównym celem założonym w przedstawionej rozprawie było poznanie właściwości trygoneliny oraz jej analogów jako potencjalnych związków, które mogą być wykorzystane w profilaktyce i leczeniu choroby Alzheimera. Związek ten został wyselekcjonowany do badań przez zespół naukowy kierowany przez Pana Profesora Romana Kaliszana po wnikliwej analizie literaturowej a wybór zaproponowanych związków został dobrze uzasadniony przez doktoranta.

Pierwszy etap badań obejmował modelowanie mechanizmu oddziaływania trygoneliny oraz jej analogów strukturalnych z cząsteczką amyloidu β. Procedura dokowania molekularnego została przeprowadzona przy współpracy z Katedrą Chemii Nieorganicznej oraz Katedrą Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego. Celem dokowania molekularnego było wyselekcjonowanie badanych

związków z mogących wchodzić w interakcje resztami aminokwasowymi uznanymi za kluczowe w procesie agregacji – z tyrozyną w pozycji 10 oraz histydyną w różnych pozycjach. Spośród 25 związków wyselekcjonowano 7 jako potencjalne ligandy dla $A\beta_{1-42}$. Analizując Tabelę 3 (str 75) oraz Tabelę 4 (str 77) nasuwa się pytanie:

- na jakiej podstawie wyselekcjonowano 7 związków (Tabela 4)? W Tabeli 3 np. dla niewybranego do dalszych badań związku nr 10 (chlorek 1-heksadecylopirydyniowy) procentowy udział lokowania się w danym rejonie cząsteczki $A\beta_{1-42}$ wynosił 82% oraz 22% odpowiednio dla His13 i His14, znacznie więcej niż dla np. związku nr 22, został poddany dalszym badaniom.

Drugi etap badań obejmował wykorzystanie wyselekcjonowanych ligandów do badań cytotoksyczności i został przeprowadzony we współpracy z Zakładem Biologii Komórki, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii GUMed oraz UG. Badania z wykorzystaniem wskazanej linii komórkowej wykazały, ze wszystkie wyselekcjonowane związki za wyjątkiem związku nr 22 charakteryzowały się brakiem istotnej toksyczności w stężeniu poniżej 100μM. W tym miejscu również powstaje pytanie:

- na jakiej podstawie dokonano doboru użytego testu w postaci linii ludzkiego nowotworu neuroblastoma SH-SY5Y. Czy są wskazane standardy odnośnie badań cytotoksyczności dla wybranych/potencjalnych związków/leków we wskazanej jednostce chorobowej?

Ostatni etap badań obejmował opracowanie i walidację metody analitycznej pozwalającej na ilościowe oznaczania trygoneliny celem oszacowania stężeń w surowicy krwi oraz mózgu. Na tym etapie badań wykorzystano chromatografię oddziaływań hydrofilowych sprzężoną ze spektrometrią mas (HILIC/ESI-MS/MS). Badania farmakokinetyczne wykazały umiarkowaną przenikalność trygoneliny do ośrodkowego układu nerwowego. W tym momencie nasuwają się pytania:

- czy badaniem poziomu leku w mózgu objęto całą strukturę (jako narząd) czy poszczególne części?
- podając wartość parametru logBB byłoby wskazane podać przykładowe wartości innych leków, które charakteryzują się łatwym przejściem bariery krew-mózg aby ułatwić interpretację wyniku przez potencjalnego czytelnika

Bardzo dobrze oceniam przedłożoną do recenzji pracę. Dobrze postawione cele, umiejętność wyciągania wniosków, konsekwentna realizacja zadań badawczych, akceptacja badań przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz przyznanie środków finansowych w ramach grantu Preludium Narodowego Centrum Nauki potwierdzają wysoki poziom badań. Na uwagę należy podkreślić fakt, iż przeprowadzone zadania badawcze (od badań *in silico* do *in vivo*) mają charakter interdyscyplinarny i wymagały od doktoranta dużej wiedzy i doświadczenia a przede wszystkim umiejętności współpracy ze wcześniej opisanymi zespołami z różnych jednostek naukowych. Warto również zwrócić uwagę, że Pan mgr Damian Szczesny jest współautorem pięciu publikacji z czego jedna dotyczy tematyki przedstawionej rozprawy doktorskiej (*J. Chromatogr* B, IF 2,729) a swoją wiedzę i umiejętności udoskonalał podczas licznych szkoleń i staży, w tym m. in. u Pana Prof. Tadeusza Malińskiego, w Katedrze Chemii i Biochemii na Uniwersytecie Ohio.

Przedstawione w powyższej recenzji uwagi nie zmieniają mojej pozytywnej oceny co do rozprawy doktorskiej i jednocześnie stwierdzam, iż odpowiada ona wymaganiom stawianym przez obowiązujące przepisy. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z OML o dopuszczenie Pana magistra Damiana Szczesnego do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Leków
dr hab. Michał Marszałł, prof. UMK