



<http://www.nil.gov.pl>

Dyrekcja: (22) 851-43-69
(22) 851-44-96

Fax: (22) 841-06-52

Kancelaria (22) 841-36-51

Biuro Organizacji
Badań Kontrolnych
i Naukowych: (22) 841-36-51
w.138
Księgowość (22) 851-43-76

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Raczak – Gutknecht pt.:

”Ocena farmakologiczna udziału receptorów α_2 -adrenergicznych w efektach mydriatycznych pochodnych imidazoliny w oparciu o analizę ilościowych zależności struktura – aktywność (QSAR)”

Istotą odpowiedzi organizmu na lek jest jego oddziaływanie z receptorem. Nieustającym problemem w przypadku większości produktów leczniczych z różnych grup ATC jest selektywność, tj. uzyskanie w projektowaniu leku jej jak najwyższego stopnia, co znalazłoby odbicie zarówno w efekcie terapeutycznym, jak i znacznym ograniczeniu objawów niepożądanych. Wszelkie próby zatem, podejmowane w celu uzupełnienia charakterystyki danej cząsteczki leku o dane dotyczące jej specyficzności i wybiórczości są na wagę złota i wpływają potencjalnie na ulepszanie nowoprojektowanych analogów. Ciekawą i wartą zainteresowania pod tym względem jest grupa leków oddziałujących z receptorami α_2 -adrenergicznymi, będących pochodnymi imidazoliny. Różnorodność strukturalna i wielokierunkowość działania leków z tej grupy: działanie hipotensyjne, antyarytmiczne, neuroprotektoryjne na siatkówkę oka, przeciwuczuleniowe, ogólnie znieczulające, czy przeciwbólowe determinują też stosunkowo szeroki zakres interferowania z licznymi typami receptorów i, co za tym idzie, wywoływanie efektów pozaterapeutycznych, tj. niepożądanych. Niektóre z w/w efektów, jak hipotensja i bradykardia korelują w układzie dawkozależnego efektu mydriazy (rozszerzenia źrenicy)

Celem pracy Doktorantki była ocena udziału ośrodkowych receptorów α_2 -adrenergicznych i ich podtypów w efekcie mydriazy w oku szczura w wyniku działania wybranych pochodnych imidazoliny, mająca dać odpowiedź na pytanie dotyczące selektywności działania poszczególnych związków w odniesieniu do określonego podtypu receptorów α_2 -adrenergicznych, z jednoczesnym wskazaniem kierunków modyfikacji strukturalnej pochodnych imidazolinowych polepszających ich selektywność i specyficzność.

Praca obejmowała dwa etapy: oznaczenie parametrów farmakodynamicznych badanych związków, tj.: powinowactwa receptorowego i wpływu antagonistów receptorowych na siłę działania związków oraz określenie ilościowych zależności aktywności i struktury metodą QSAR w oparciu o parametry struktury uzyskane metodami chemii obliczeniowej.

Przedmiot badań stanowiło 20 związków – pochodnych imidazoliny, w tym dwie nowe pochodne: marsanidyna i chlorowodorek 7-metylomarsanidyny.

W badaniach zastosowano selektywnych i nieselektywnych antagonistów określonych podtypów receptora α_2 -adrenergicznego.

Wydział Farmaceutyczny z OML GUMed
D Z I E K A N A T

Wpłynęło dnia ... 31.05.10A

Liczba dziennika 153/2017

Efekt mydriazy oceniano w toku eksperymentu farmakologicznego z użyciem szczurów szczepu Wistar za pomocą mikroskopu stereoskopowego z możliwością cyfrowej rejestracji wyników eksperymentu. Badania na zwierzętach wykonywano za zgodą lokalnej Komisji Etycznej ds. doświadczeń na zwierzętach w Gdańsku (Uchwała nr 46/2011 z dnia 14.11.2011).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy użyciu testów: ANOVA i Tukey'a.

Analiza strukturalna badanych pochodnych obejmowała:

- oznaczenie lipofilowości metodą HPLC sprzężonej ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu, w układzie faz odwróconych;
- modelowanie cząsteczkowe i obliczenia deskryptorów strukturalnych, tj.: energii najwyższego zajętego i najniższego niezajętego orbitalu molekularnego; momentu dipolowego, maksymalnych i minimalnych elektronowych ładunków elektronowych na poszczególnych atomach w cząsteczkach imidazolin, energii całkowitej, masy cząsteczkowej, refrakcji molowej, polaryzowalności, powierzchni i objętości Van der Waalsa, parametru elektronowego oraz subcząsteczkowego parametru polarności.

W oparciu o wyznaczone deskryptory wykonano analizę QSAR.

Przeprowadzone doświadczenia, uzyskane wyniki, dyskusję i wnioski Doktorantka opisała w formie rozprawy.

Rozprawa składa się z 12-tu części, zatytułowanych kolejno: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Spis tabel i rycin, Curriculum vitae, Lista publikacji (w tej części wymieniono publikacje, których Doktorantka była współautorem).

Całość pracy skonstruowana jest w sposób zwarty, logiczny i uporządkowany. Tekst dopracowany jest redakcyjnie, zawiera bardzo nieliczne drobne błędy literowe. W kilku miejscach pojawiają się błędy językowe i stylistyczne, jak np. na str. 19: „(...) nie są dotychczas znane selektywne agonisty” zamiast: „selektywni agoniści”, czy na str. 39: „(...) w nieobecności braku obecności antagonisty”.

Wstęp. W tej części, podzielonej na podrozdziały, Doktorantka w sposób przejrzysty nakreśliła tło prowadzonych przez siebie badań i jednocześnie uzasadnia zaprojektowane eksperymenty.

Wstęp liczy 31 stron i poparty jest danymi ze 113 pozycji piśmiennictwa. Fakt, że większość prac z ostatnich 5 lat, o tematyce zbliżonej do tematyki recenzowanej pracy powstała w UM Gdańsk, świadczy o oryginalności tematów podejmowanych w tym obszarze i konieczności prowadzenia badań w tym kierunku.

Niewielkie uwagi do tej części to: brak wyjaśnienia pojęcia „presynaptycznych autoreceptorów” i niejasne odesłanie do źródła fragmentu tekstu na str. 15, tj.: (Grabowska 1997).

Cel pracy określono zgodnie z zakresem prowadzonych badań i uzasadnieniem ich zaplanowania wynikającym ze Wstępu pracy.

Materiały i metody. W tej części pracy Autorka zawarła opisy wszystkich stosowanych metod z odpowiednim komentarzem. Umieściła też niezwykle przydatny w odbiorze całości pracy podrozdział dotyczący deskryptorów strukturalnych.

Podkreślić należy bardzo rzetelny warsztat badawczy, jaki opanowała Doktorantka, co przekłada się też na solidne projektowanie eksperymentów, jak uwzględnienie próby ślepej w badaniu mydriazy dla wyeliminowania wpływu objętości podawanych roztworów na szerokość źrenicy oka szczura.

Zabrakło jednak uzasadnienia dla wybranych zakresów dawek badanych pochodnych i inhibitorów.

Wyniki. Wyniki przedstawiono w formach: opisowej, wykresów z uwzględnieniem analizy statystycznej i Tabeli w sposób bardzo staranny i czytelny.

Zapewne ogrom wyników i opracowywanej dokumentacji z badań stanowił powód pominięcia pewnych danych w tej części, jak np.: zabrakło prezentacji i opisu wyników (przynajmniej wybranych) analizy statystycznej. Ta bardzo czasochłonna część eksperymentów na wszystkich etapach została przez Doktorantkę skrócona do lakonicznych stwierdzeń, że wykazano bądź nie wykazano korelacji (pkt. 3, str. 65, str. 66). Podobnie, w prezentacji wyników pominięto bardziej szczegółowe dane, omawiane w tekście, tj.: masę molową, objętość i powierzchnię Van der Waalsa.

Brak jest wyjaśnienia w tekście bądź w opisie wykresów, jaką wielkością określano odchylenia \pm od podanych wyników badania efektu mydriazy (SD?).

Brak jest legendy do Tabeli 3, co utrudnia odbiór skrótów, do których wyjaśnień trzeba szukać w tekście. Nie wszystkie zresztą skróty, użyte w tej Tabeli zostały w tekście wyjaśnione [Objętość (Grid)].

Zważywszy też na podpisy pod wykresami i zdjęciami – „Rys.,” niejednolity z tym skrótem wydaje się tytuł rozdziału X – Spis Tabel i rycin. Rys. (ryc.?) 23 natomiast, należało by zaliczyć raczej do fotografii niż rycin.

Dyskusja. Dyskusja liczy ponad 8 stron. Czytając tę część ma się przekonanie, że Doktorantka w pełni panuje nad ogromną ilością uzyskanych w pracy wyników. Umiejętnie przytacza doniesienia innych autorów, osadzając tym samym rezultaty własnych badań w obszarze dostępnej już na ten temat wiedzy. W Dyskusji Doktorantka opisuje też częściowo wyniki, jednak w tym przypadku nie jest to niepotrzebne powtarzanie fragmentów tekstu z poprzedniego rozdziału pracy, ale wręcz konieczne dla właściwego zobrazowania przemyśleń Autorki na tle danych literaturowych.

Doktorantka wykazuje też, niezbędny w pracy naukowca dystans i krytycyzm wobec wyników swoich badań, co znalazło odbicie w odniesieniu do analizy QSAR i niemożności wyciągnięcia konstruktywnych wniosków dotyczących zależności struktury badanych cząsteczek i aktywności farmakologicznej poszczególnych związków. Autorka stara się w toku dyskusji znaleźć potencjalne przyczyny tego niepowodzenia.

Przy takiej liczbie badanych związków, zakresie stosowanych metod i ilości wyników do opracowania, trudno uniknąć pewnych nieścisłości i przeoczeń. Poniżej kilka uwag do tej części pracy:

- na str. 67 podano i omówiono wartości pK_i potwierdzające obecność określonego typu receptora adrenergicznego w różnych rodzajach komórek - z tekstu nie wynika, jakie było źródło tych danych, własne prace Doktorantki, czy literatura?

- na str. 69 omawiając zależność właściwości fizykochemicznych i działania ośrodkowego mar sanidyny i 7-metylomarsanidyny, Doktorantka nie odsyła do własnych wyników, zaprezentowanych w Tabeli 3, ale do poszczególnych pozycji piśmiennictwa (?)

- na str. 69 przeoczono też różnicę (bądź jest to pomyłka) w wartościach CLOGP/ACD wyznaczonych dla 7-metylomarsanidyny, podanych w Tabeli 3, tj.: 0,56 i omawianych w toku dyskusji: 1,70.

Wnioski. Wnioski są, w oparciu o przeprowadzone doświadczenia i uzyskane wyniki, w pełni uprawnione i prawidłowo sformułowane.

Należy zwrócić uwagę, że uzyskane wyniki pozwoliły Autorce na wyciągnięcie tak konstruktywnych konkluzji, jak ścisłe określenie funkcji dwóch nowych badanych pochodnych, w odniesieniu do receptorów α_2 -adrenergicznych, jak i samych receptorów (wnioski nr 3 i 5).

Dodatkową wartością pracy jest potwierdzenie użyteczności modelu mydriazy u szczurów, poparte solidnym opracowaniem statystycznym.

Podsumowanie

Rozprawa dotyczy niezwykle ważkiego obszaru zagadnień związanych z badaniem i precyzyjnym określaniem punktów uchwytu leków. Możliwości warsztatowe, ale także rozwój metod teoretycznych i programów komputerowych, odpowiednio wykorzystane pomagają wyjaśnić mechanizmy znanych leków i, tym samym, projektować analogi o lepszej skuteczności i maksymalnie ograniczonych działaniach niepożądanych. Część takich właśnie badań wykonała i opisała Doktorantka. Potwierdziła jednocześnie swoje umiejętności w stosowaniu szerokiego spektrum metod ,począwszy od badań na zwierzętach, po umiejętność korzystania z metod analizy instrumentalnej i obliczeń teoretycznych.

Eksperymenty zostały zaplanowane w sposób przemyślany tak, aby na podstawie wyników można było wyciągnąć konkretne wnioski. Interakcje pochodnych imidazolinowych z receptorem α_2 -adrenergicznym potwierdzono z użyciem szeregu inhibitorów, a analizę strukturalną przeprowadzono bardzo dogłębnie, uwzględniając szeroki wachlarz deskryptorów strukturalnych.

Wszystkie wyniki w analizie farmakologicznej opracowano statystycznie.

Zakres przeprowadzonych badań w pełni uprawnił Doktorantkę do sformułowanych w pracy wniosków.

Przedstawione uwagi, ze względu na podjęty temat i jego wartość użytkową nie umniejszają wartości prezentowanej pracy. Należy podkreślić właściwe zaprojektowanie całości doświadczeń w ramach podjętego tematu, bogactwo metodyczne i rzetelne opracowanie wyników, co przy tak szerokim zakresie wykonanych eksperymentów wymaga ogromnej pracy i zasługuje na uznanie.

Praca spełnia ustawowe warunki stawiane rozprawom doktorskim. Na jej podstawie, wnoszę o dopuszczenie mgr Joanny Raczak-Gutknecht do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ogrom wykonanej pracy, uzasadniony zakres właściwie zaprojektowanych doświadczeń, składające się na bardzo solidną podbudowę w pełni uprawnionych konkluzji, skłaniają mnie do wnioskowania o wyróżnienie powyższej pracy.

Dr hab. Beata Gruber-Bzura, prof. NIL

Warszawa, 25.05.2017

