Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownia Modelowania Komputerowego

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-535 73 55

Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab

Faculty of Pharmacy with Division of Medical Analytics
Medical University of Lublin
4A Chodzki str., 20-093 Lublin, Poland
*Phone/fax *048-81-535 73 55*

Lublin, 25-07-2017

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Grzegorz SATAŁA
z Zakładu Chemii Leków,
Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie
pt. „Allosteryczna modulacja receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_7 przez jony cynku".

Postęp jaki w ostatnich latach nastąpił w poszukiwaniu nowych leków – nowe cele molekularne i coraz szersza wiedza o skutkach ich aktywacji lub dezaktywacji może być zrozumiane jako osiągnięcie ilościowej i jakościowej granicy poznania. Może się wydawać, że teraz powinno już być łatwo i przyjemnie. Nic bardziej mylnego. Jeszcze 20-15 lat temu poszukiwano selektywnych agonistów lub antagonistów białek receptorowych. Potem zrozumiano, że selektywność jest dobra dla narzędzi farmakologicznych ale nie jest dobra dla leków. Zaczęto poszukiwać leków o działaniu wielokierunkowym. „Brudnych" ale zapewniających działanie na kilka celi zaangażowanych na różnych etapach w tą samą jednostkę chorobową. Od kilku lat hasłem przewodnim stała się allosteria oraz pozytywne i negatywne modulatory. Allosteria łączy się także z „biased" agonizmem. Ciekaw jestem, jaki będzie następny krok. Pewnie oligomeryzacje i kooperatywność pomiędzy oligomerami. Badania allosterii wyjaśniły bardzo wiele działań ubocznych, pozytywnych lub negatywnych. Pozwoliły również na poznanie roli jonów metali, oczywiście oprócz ich dobrze znanej roli konstytucyjnej, w pobudzaniu lub hamowaniu białek. Wiemy już coraz więcej o roli takich metali jak magnez, miedź, wapń, mangan. Jony sodu są negatywnymi modulatorami receptora opioidowego mu.

Bardzo ważnym metalem jest także cynk, któremu poświęcona jest przedstawiona do oceny rozprawa.

Cynk oprócz pełnienia bardzo istotnej roli konstytucyjnej – katalitycznej i strukturalnej (miejsca aktywne ponad 300 enzymów, czynniki transkrypcyjne), jony cynku obecne w przestrzeni wewnątrz- i pozakomórkowej wpływają na aktywność szlaków sygnałowych kontrolujących wiele procesów komórkowych. W oun jony cynku pełnią również rolę neuromediatorów wpływających na aktywność wielu białek receptorowych, a ich rola jako mediatora sygnalizacji neuronalnej została potwierdzona już w latach 80-tych ubiegłego wieku. Niestety w ciągu minionego ćwierćwiecza nie udało się wyjaśnić wszystkich mechanizmów działania cynku (czy tez innych jonów). Tym bardziej, że efekty są bardzo często złożone, zależne od stężeń i innych kofaktorów. Widać więc, że wyjaśnienie tych wątpliwości wymaga dalszych badań.

Praca, którą otrzymałem do recenzji jest bardzo dobrym przykładem podjęcia próby takiego poszerzenia naszej wiedzy i wyjaśnienia zagadnienia mechanizmu oddziaływania jonów cynku w obrębie grupy receptorów serotoninowych, a szczególnie z receptorami 5-HT_{1A} i 5-HT_7. Jest to bardzo istotne z uwagi na silne zaangażowanie tych receptorów w etiologię zaburzeń psychicznych, lęku, depresji i innych funkcji oun, przy całkowicie przeciwnym mechanizmie efektorowym (odwrotnym wpływie na cyklozę adenylową).

Mgr Grzegorz Satała, poszerzając badania prowadzone od wielu lat w Zakładzie Chemii Leków, Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie w zespole prof. dr hab. Andrzeja Bojarskiego oraz jego poprzedników, zaplanował i wykonał ciąg badań obejmujących ilościową charakterystykę oddziaływań jonów cynku z oboma typami receptorów oraz zmianami w ich aktywności zakładając allosteryczny model oddziaływania. Badania wykonano metodami farmakologii komórkowej na transfekowanej linii komórkowej z ekspresją odpowiednich receptorów. Jako linię komórkową zastosowano komórki HEK a jako substancje porównawcze agonistów i antagonistów odpowiednich receptorów. Pozwoliło to na jednoczesne zbadanie powinowactwa i mechanizmu modulacji receptora ale także kompetycji do miejsca ortosterycznego i wpływu na siłę wiązania ligandów ortosterycznych.

Praca doktorska mgr Grzegorza Satały przedstawiona do recenzji jest opracowana w bardzo przystępnej i logicznej formie. Opiera się na dwóch publikacjach naukowych opublikowanych w czasopiśmie o bardzo szerokim zasięgu (IF=6.19). Prace opublikowane zostały wzmiankowane w tekście w części

poświęconej dyskusji wyników oraz dołączone do rozprawy. Myślę, że warto byłoby przedstawić dane tych publikacji na początku treści rozprawy, dla podkreślenia ich wagi.

Doktorant temat badań zaprezentował w pracy w sposób obszerny i wyczerpujący. Po bardzo interesującej części teoretycznej, w której omówił allosterię, cechy modulacje allosteryczne, allosterię wśród GPCR-ów, i co muszę szczególnie podkreślić za swą unikalność teoretyczne modele oddziaływań ligand-receptor, występowanie cynku i jego rolę w oun a także receptory 5-HT_{1A} i 5-HT_7 jako potencjalne cele farmakologiczne w zaburzeniach oun, autor przedstawił ideę i cel badań, wyniki, dyskusję, materiały i metody, bibliografię oraz załączniki (obie publikacje). Parametry z niektórych teoretycznych modeli oddziaływań LR zostały wykorzystane w analizie wyników co dowodzi ich skuteczności i możliwości aplikacyjnych.

Prezentując ideę i cel badań doktorant przytoczył pewne badania wyprzedzające zarówno autorów obcych jak i własne. Badania te potwierdziły jedynie potencjalny allosteryczny mechanizm modulacji ale nie wyjaśniały jej wszystkich aspektów. Przeprowadził więc badania na obu typach receptorów, które obejmowały wpływ jonów cynku na wiązanie selektywnych radioligandów (8-OH-DPAT do 5-HT_{1A}; 5-CT, SB-269970 i mesulerginy do 5-HT_7), współzawodnictwo o miejsce wiążące tych radioligandów oraz wypieranie i dysocjację radioligandów z miejsc wiążących. Zbadał również wpływ na aktywność funkcjonalną obu receptorów a dla potwierdzenia selektywności działania cynku zbadał również wpływ innych (Na, K, Mg, Ca) jonów na wiązanie radioligandów. Wszystkie etapy badań począwszy od transfekcji a kończąc na badaniach kompetycji i dysocjacji były gruntownie weryfikowane aby uniknąć artefaktów.

Wyniki badań zaprezentowano i omówiono w sposób zwięzły ale wyczerpujący. Metody omówiono w sposób łatwy do powtórzenia ze wszystkimi koniecznymi szczegółami. Najważniejsze wyniki projektu doktorant przedstawił w 4-punktowym podsumowaniu (brawo za maksymalną zwięzłość). Przede wszystkim potwierdził odmienny mechanizm modulacji dla receptora 5-HT_{1A} i 5-HT_7. W stosunku do receptora 1A jest to pozytywna modulacja allosteryczne w dawkach fizjologicznych (10 μM). W przypadku receptora 7 jest to negatywna lub neutralna modulacja zależna od stężenia i rodzaju liganda.

Wyniki są bardzo interesujące i wyjaśniają wiele jeżeli chodzi o podobieństwa i różnice pomiędzy receptorami. Bardzo interesującym dodatkiem byłoby modelowanie

molekularne zachowania jonów cynku w odpowiednich receptorach, szczególnie ich dynamika. Podejrzewam jednak, że taki materiał byłby podstawą do następnego doktoratu. Byłbym wdzięczny gdyby doktorant wyraził swój pogląd w tej sprawie.

Praca jest napisana językiem prostym i zrozumiałym i znalazłem tylko kilka uwag językowych. Najpoważniejszą jest chyba brak tłumaczenia ostatniego akapitu Abstraktu z wersji polskiej na wersję angielską. Na stronie 85 związek SB-269970 raz określany jest jako odwrotny agonista (wspólnie z mesulergina) a następnie selektywny antagonista. Pozostałe przekażę doktorantowi indywidualnie, gdyż są bardzo drobne i myślę, że spokojnie mogę je pominąć w tej recenzji.

Niewątpliwym sukcesem doktoranta było potwierdzenie allosterycznej modulacji receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7 oraz ich mechanizmów (pozytywny i negatywny). Daję to znakomite podstawy do dalszych badań, szczególnie nad wpływem jonów cynku na aktywność ligandów stosowanych w różnych jednostkach chorobowych, takich jak lęk i depresja. Może suplementacja cynkiem będzie mogła wspomóc te leki dla osiągnięcia lepszych efektów leczniczych.

W oparciu o przedstawione wyniki badań mogę stwierdzić, że cele pracy jakie postawił sobie doktorant zostały w pełni osiągnięte.

Oczywiście uwagi zawarte w recenzji pozostają bez wpływu na moją bardzo wysoką oceny pracy doktorskiej mgr Grzegorza Satały i uważam, że spełnia ona warunki stawiane pracom doktorskim. Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Grzegorza Satały do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie mu tytułu doktora nauk farmaceutycznych. Z uwagi na multidyscyplinarność pracy i bardzo szeroki profil eksperymentalny wymagające od doktoranta wielu umiejętności i szerokiej wiedzy stawiam wniosek o przyznanie tytułu doktora nauk farmaceutycznych z wyróżnieniem.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Środków Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny