Prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 5.02.2018 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Sabiny Rybki pt. „Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych aminoalkilowych pochodnych sukcynimidu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej" wykonanej w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Jedną z chorób, wciąż w wielu ludziach budzących strach, a może właściwiej powiedzieć: odrazę, jest padaczka. Wielu z nas na widok człowieka w trakcie napadu drgawek odwraca wzrok. Z pozoru nie widać, że ktoś choruje na padaczkę, a jednak jest to choroba okrutna. Powoduje całe mnóstwo ograniczeń, nie pozwala normalnie żyć. Jeśli ktoś interesuje się postępami w leczeniu padaczki to wie, że pojawiają się nowe leki, które mają być tymi lepszymi. Ale czy są? Jeśli by tak było, to chyba nie stosowano by fenytoiny, odkrytej prawie 100 lat temu. Ostatnio głośno było o leczniczej marihuanie. Ale czy jest bezpieczna? Na to pytanie wciąż nie znamy odpowiedzi.

W większości przypadków leczenie farmakologiczne daje zadowalające rezultaty tzn. zahamowanie napadów przy niezbyt nasilonych działaniach niepożądanych. Jednak istnieje duża grupa pacjentów z padaczką lekooporną, nie kwalifikujących się również do leczenia operacyjnego, dla nich nadzieją są laboratoria badawcze.

W Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie od wielu lat prowadzone są badania nad poszukiwaniem nowych substancji o działaniu przeciwdrgawkowym w grupie pochodnych pirolidyno-2,5-dionu. Praca doktorska Pani Sabiny Rybki jest kontynuacją badań prowadzonych w zespole Pani profesor Jolanty Obniskiej. Przedstawiona została w formie cyklu pięciu artykułów naukowych opublikowanych w latach 2014-2017 w *Archiv der Pharmazie, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, Biooorganic and*

Medicinal Chemistry Letters oraz ChemMedChem, o łącznym współczynniku oddziaływania IF=14,42, opatrzonych 35-stronicowym komentarzem w języku polskim. Prace mają charakter opracowań wieloautorskich, ale Doktorantka jest w każdej z nich pierwszym autorem, co świadczy o jej wiodącej roli w prezentowanych badaniach.

Komentarz zawiera wprowadzenie, cel i założenia pracy, krótką charakterystykę poszczególnych etapów pracy tj. badań chemicznych, farmakologicznych, radioreceptorowych, badań lipofilowości, metabolizmu, podsumowanie wyników, wnioski oraz piśmiennictwo. Napisany jest dobrze pod względem stylistycznym i językowym. Doktorantka posługuje się precyzyjnym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i cytowane, liczy 77 pozycji, pochodzących w znaczącej większości z XXI wieku.

We wprowadzeniu Doktorantka uzasadnia celowość podjętych badań. Podaje krótką charakterystykę napadów padaczkowych, a także opisuje aktualne kierunki poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Sabiny Rybki było otrzymanie sześciu serii pochodnych pirolidyno-2,5-dionu. W pierwszym etapie pracy Doktorantka otrzymała odpowiednie kwasy bursztynowe, stanowiące substraty do dalszych syntez. Związki finalne zostały otrzymane w oparciu o dwa typy reakcji: reakcję aminometylowania imidów kwasów bursztynowych z wykorzystaniem pochodnych piperazyny, piperydyny oraz morfoliny oraz reakcję cyklokondensacji odpowiednich kwasów z aminoalkilopiperazynami. Doktorantka zsyntetyzowała aż 132 nowe pochodne! Strukturę otrzymanych związków potwierdziła metodami spektralnymi, czystość i jednorodność metodami chromatograficznymi oraz analizą elementarną.

Wszystkie otrzymane związki zostały przekazane do badań farmakologicznych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej. Wykonano badania *in vivo*, które obejmowały: test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES), test drgawek kardiazolowych (scPTZ) oraz dla 11 pochodnych, które wykazywały aktywność w teście MES i/lub scPTZU wyznaczono skuteczność w teście 6 Hz, stosowanym do identyfikacji substancji skutecznych w padaczce lekoopornej. Ponadto, wszystkie związki poddano ocenie neurotoksyczności w teście obracającego się pręta (rotarod). Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka ustaliła zależności pomiędzy strukturą a aktywnością w badanej grupie związków, które zostały jasno sprecyzowane w rozdziale Podsumowanie i wnioski. Dalszym etapem pracy było ustalenie mechanizmu działania nowych połączeń. W tym celu wykonano badania radioreceptorowe.

Stwierdzono, że działanie pochodnych pirolidyno-2,5-dionu jest związane z blokowaniem wysokonapięciowych kanałów sodowych i/lub wapniowych typu L.

Kolejnym celem badawczym było wyznaczenie lipofilowości, jednego z ważniejszych parametrów fizykochemicznych związków aktywnych biologicznie, determinujących ich biodostępność. Badania lipofilowości wykonano metodą ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem mas (UPLC/MS) oraz wyznaczono parametry lipofilowości przy użyciu programów ACD/Labs oraz ChemBioDraw. Na podstawie wyznaczonych wartości współczynnika podziału logP przeprowadzono analizę zależności pomiędzy lipofilowością a aktywnością przeciwdrgawkową. Kolejnym etapem pracy badawczej była próba ustalenia możliwych dróg biotransformacji nowootrzymanych pochodnych. Badania przeprowadzono dla dwóch związków, różniących się struktura oraz aktywnością przeciwdrgawkową przy użyciu mysich mikrosomów wątrobowych. Wykazano, że metabolizm badanych pochodnych polega m.in. na procesach N-dealkilacji i hydroksylacji.

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte wyniki stanowią istotny wkład w poszukiwanie nowych związków o aktywności przeciwdrgawkowej. O dużej wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie wyników w postaci pięciu artykułów w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, o czym wspomniałam na wstępie recenzji.

Jedna uwaga jaką mam dotyczy udziału Doktorantki w poszczególnych etapach badań. Bezsprzecznie Pani Sabina Rybka wykonała wszystkie syntezy. W przedstawionym komentarzu jest napisane, gdzie zostały wykonane badania farmakologiczne oraz radioreceptorowe, brak jest jednak określenia kto wykonał badania lipofilowości i metabolizmu. Czy Doktorantka brała udział w tych badaniach? Druga uwaga – zarówno w publikacji, jak i w komentarzu pojawia się zdanie, z którym nie do końca się zgadzam: „Wyznaczona średnia wartość współczynnika korelacji pomiędzy wartościami log P, otrzymanymi za pomocą wspomnianych metod wynosi 0.972. Dowodzi to o słuszności wybranej metody eksperymentalnej". Z mojego doświadczenia wynika, że walidacji poddaje się narzędzie badawcze służące do przewidywania wartości współczynnika podziału, a nie odwrotnie. Zważywszy na fakt, że wspomniana praca została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie, należy założyć, że dowód ten jest słuszny. Po raz pierwszy spotykam się z taką interpretacją wyników, będę więc wdzięczna jeśli Doktorantka krótko przedstawi argument przemawiające za słusznością przedstawionego dowodu.

Autorka nie ustrzegła się błędów stylistycznych i językowych. Znajdują się na stronach 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 32, 34, 47, 49, 51.

Przedstawione uwagi oraz błędy redakcyjne nie wpływają na moją wysoką ocenę pracy.

Reasumując, przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Sabiny Rybki pt. „Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych aminoalkilowych pochodnych sukcynimidu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej" uważam za nowatorską, interesującą w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest niezwykle ważna i aktualna. Na szczególną uwagę zasługuje również zwięzłe przygotowanie redakcyjne komentarza, co z uwagi na ilość przeprowadzonych badań nie było proste. Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską mgr Sabiny Rybki do wyróżnienia.

Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Sabiny Rybki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.