



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sabiny Rybki

**p.t. „Synteza i właściwości fizykochemiczne nowych aminoalkanolowych pochodnych
sukcynimidu o potencjalnej aktywności przeciwdrgawkowej”,**

wykonanej w Katedrze Chemii Farmaceutycznej, Zakładzie Chemii Leków

Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum

Promotor prof. dr hab. Jolanta Obniska

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej pani mgr Sabiny Rybki głównym celem badań było ustalenie zależności pomiędzy budową chemiczną aminoalkanolowych pochodnych sukcynimidu a ich aktywnością przeciwdrgawkową. Bardzo szeroko zaprojektowane przez Doktorantkę badania obejmowały syntezę szeregu nowych pochodnych pirolidyno-2,5-dionu - związków o spodziewanym działaniu przeciwdrgawkowym, przeprowadzenie badań farmakologicznych *in vivo* w zwierzęcych modelach padaczki, wyznaczenie lipofilności otrzymanych związków, a dla wybranych aktywnych pochodnych badania radioreceptorowe i ustalenie metabolizmu.

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania wpisują się więc w zakres chemii medycznej i są kontynuacją prowadzonych od lat w Katedrze Chemii Farmaceutycznej UJ CM poszukiwań związków przeciwdrgawkowych w grupie pochodnych 1,3-podstawionego pirolidyno-2,5-dionu.

Poszukiwanie nowych leków przeciwpadaczkowych jest znacząco utrudnione przez różnorodność przyczyn występowania napadów padaczkowych, a co za tym idzie brak dokładnej wiedzy o etiopatogenezie, mechanizmach działania, celach molekularnych. Stąd utrudnione jest zarówno poszukiwanie nowych leków ukierunkowane na odpowiedni cel

biorący udział w patomechanizmie jak i tzw. podejście racjonalne, oparte na chemii obliczeniowej, syntezie kombinatorycznej oraz szybkich testach przesiewowych.

O wiele szerzej wykorzystywanym narzędziem w poszukiwaniu nowych substancji o pożądanych właściwościach terapeutycznych są tu zwierzęce modele padaczki. Dają one możliwość identyfikacji związków o nieznanym, czasem innowacyjnym mechanizmie działania. Badania zaprojektowane i przeprowadzone przez Doktorantkę wpisują się w ten typ „niemechanistycznego” podejścia do poszukiwania nowych leków przeciwpadaczkowych.

Podstawą ocenianej rozprawy jest pięć publikacji w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, posiadających wysoki sumaryczny współczynnik oddziaływania równy 14,42. Całość dysertacji uzupełnia 57-stronicowe podsumowanie zawierające: cel pracy, krótką analizę stosowanej metodyki i osiągniętych w kolejnych etapach pracy wyników, wnioski, streszczenie oraz wykaz prac wchodzących w skład rozprawy. Powoduje to, że układ pracy jest bardzo czytelny. Dołączony do podsumowania przegląd piśmiennictwa jest szeroki; obejmuje 77 pozycji, w wysokim procencie opublikowanych w okresie ostatnich 10 lat. Stanowi on klarowną podstawę dla postawionej przez doktorantkę hipotezy badawczej.

W materiałach otrzymanych do oceny brak jest natomiast oświadczeń wszystkich współautorów publikacji stanowiących podstawę rozprawy, określających ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac (publikacje są wieloautorskie). Trudno więc jednoznacznie recenzentowi ocenić udział Doktorantki w tworzeniu koncepcji badań, syntezie nowych pochodnych oraz określaniu właściwości fizykochemicznych i biologicznych otrzymanych związków. Znaczący udział mgr Rybki sugeruje pierwsze autorstwo wszystkich publikacji oraz fakt, że badania przeprowadzone były w ramach grantu Preludium, którego kierownikiem była właśnie Doktorantka

Biorąc pod uwagę cel i stosowaną metodykę, badania własne mgr Rybki można podzielić na pięć kolejnych etapów.

- Pierwszy, najszerszy etap pracy polegał na zaprojektowaniu i syntezie nowych pochodnych piroolidyno-2,5-dionu, przy czym modyfikacje struktury wiodącej prowadzone były kolejno:

- ✓ W położeniu 3 sukcyimidu (trzy serie związków)
- ✓ W układzie 4-arylopiperazyny połączonym z imidowym atomem azotu poprzez łańcuch alkilenowy (dwie serie związków)
- ✓ W łańcuchu alkilenowym związanym z imidowym atomem azotu

Przeprowadzone modyfikacje miały na celu zbadanie wpływu podstawnika w położeniu 3 pierścienia imidowego, oraz rolę pierścienia piperazynowego i długości łańcucha w ugrupowaniu arylopiperazynyloalkilowym przy atomie azotu na aktywność przeciwdrgawkową syntezowanych pochodnych.

W wyniku przeprowadzonych syntez Doktorantka otrzymał 132 nowe związki, których czystość i jednorodność oznaczono metodami chromatograficznymi i spektralnymi.

- Drugi etap zaprojektowanej przez Doktorantkę pracy miał na celu zbadanie aktywności przeciwdrgawkowej otrzymanych związków w zwierzęcych modelach padaczki. Był on konieczny dla przeprowadzenia zaprojektowanej analizy zależności struktura-aktywność. Zastosowane zostały trzy testy *in vivo*: dwa testy drgawek wywołanych prądem elektrycznym (MES i 6 Hz) oraz test drgawek wywołanych chemicznie (kardiazolem, scPTZ). Dla najaktywniejszych związków wyznaczono wartości dawki efektywnej (ED_{50}) oraz neurotoksycznej (TD_{50}) oraz indeks terapeutyczny. Badania przeprowadzono w Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego-Collegium Medicum. Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce stwierdzić, że połowa zaprojektowanych związków wykazała aktywność przeciwdrgawkową. Przeprowadzona przez mgr Rybkę analiza zależności aktywność-budowa doprowadziła do wniosku, że działanie przeciwdrgawkowe otrzymanych związków było ściśle związane z rodzajem podstawnika w położeniu 3- pierścienia, długością łańcucha alkilowego wiążącego azot pierścienia pirolidyno-2,5-dionu z azotem pierścienia piperazynowego oraz rodzajem komponenty zasadowej.

- W trzecim etapie pracy dla wybranych na podstawie wyników badań *in vivo* związków przeprowadzona została badania mające na celu ustalenie ich prawdopodobnego mechanizmu działania. Założony przez Doktorantkę mechanizm polegał na blokowaniu kanałów sodowych i/lub kanałów wapniowych. Badania radioreceptorowe *in vitro* powinowactwa do kanału sodowego oraz wapniowego typu L wykonane były w firmie zewnętrznej (Cerep, Francja).

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza otrzymanych wyników badań pozwoliła jej wykazać, że 4-arylopiperazynyloalkilowe pochodne sukcydimidu – poza jednym wyjątkiem – wykazywały powinowactwo do napięciowo-zależnych kanałów sodowych i wapniowych typu L. Jedyną cząsteczką, która nie wykazywała powinowactwa do kanałów wapniowych typu L zawierała w swojej strukturze trójwęglowy łącznik pomiędzy układem imidu a piperazyną, co być może wpływało na zanik aktywności. Analiza wyników badań wskazywała również na

istotny wpływ podstawnika w położeniu 4- piperazyny na stopień blokowania odpowiednich kanałów.

- Czwarty etap pracy polegał na wyznaczeniu lipofilności wybranych związków przy wykorzystaniu dwóch metod: *in silico* oraz eksperymentalnie metodą UPLC/MS. Obydwie zastosowane metody wykazały wysoki stopień korelacji pomiędzy wartościami logP. Doktorantka stwierdziła, że w badanych związkach lipofilność wyraźnie zależała od podstawnika w położeniu 3- układu imidowego. Analiza wyników badań biologicznych pozwoliła mgr Rybce również stwierdzić, że aktywność otrzymanych związków w testach *in vivo* MES oraz scPTZ skorelowana jest ze średnią wartością logP.

- W ostatnim, piątym etapie pracy Doktorantka zaplanowała przeprowadzenie badań metabolizmu metodą *in vitro* (z wykorzystaniem mysich mikrosomów wątrobowych) dla dwóch wybranych związków wykazujących wysoką aktywność przeciwdrgawkową. Uzyskane wyniki wskazały na zachodzące procesy N-dealkilacji oraz hydroksylacji. Analiza wyników badań metabolizmu jest istotna i może pozwolić Doktorantce w dalszych badaniach nad związkami tej grupy zaprojektować cząsteczki o korzystniejszej trwałości

Analizując przeprowadzone przez Doktorantkę badania, opisane w 5 publikacjach stanowiących podstawę rozprawy należy zaznaczyć, że wykazała się dużą wiedzą i doświadczeniem w realizacji wybranej tematyki, w tym umiejętnością postawienia hipotezy badawczej, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków.

Reasumując, warte podkreślenia są zalety recenzowanej pracy świadczące o dojrzałości naukowej Doktorantki:

1. Wnikliwa analiza piśmiennictwa dotyczącego poszukiwania związków o działaniu przeciwdrgawkowym umożliwiającą Doktorantce sformułowanie celu badań własnych, zawarta w części teoretycznej 5 publikacji oraz oddzielnym podsumowaniu,
2. Zaprojektowanie i otrzymanie w wyniku wieloetapowych syntez 132 nowych nieopisanych dotąd związków pochodnych wybranej struktury wiodącej oraz przeprowadzenie na podstawie wyników testów aktywności przeciwdrgawkowej wnikliwej analizy zależności działanie-budowa
3. Wysłunięcie i weryfikacja hipotezy dotyczącej mechanizmu działania wybranych aktywnych związków

4. Określenie optymalnej wartości logP dla aktywności przeciwdrgawkowej badanych pochodnych, co zapewne będzie mieć wpływ na projektowanie dalszych związków z tej grupy.

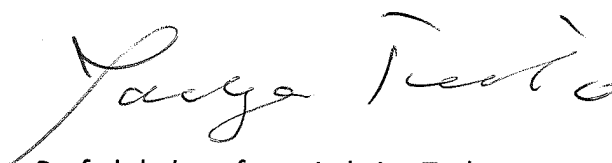
5. Zaprojektowanie wstępnych testów metabolizmu aktywnych związków których wyniki również mogą mieć wpływ na projektowanie dalszych związków z tej grupy.

Zagadnienia wymagające dodatkowego wyjaśnienia przez Doktorantkę w mojej opinii są nieliczne. Być może warto było by dokładniej uzasadnić kryteria wyboru związków do badań radioreceptorowych i metabolizmu w przypadku, gdy nie wszystkie otrzymane w danej serii aktywne pochodne były poddane takim badaniom.

Podsumowując pragnę stwierdzić, że mgr Sabina Rybka przedłożyła bardzo wartościową pracę, wnoszącą poważny wkład do wiedzy na temat zależności aktywność-budowa w grupie pochodnych pirolidyno-2,5-dionu o potencjalnym działaniu przeciwdrgawkowym. Doktorantka wykazała się zdolnością zaprojektowania i przeprowadzenia złożonych eksperymentów, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. W mojej ocenie recenzowana rozprawa odpowiada w pełni wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pani mgr Sabiny Rybka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę obszerność i wysoki poziom recenzowanej pracy, wysoki sumaryczny współczynnik oddziaływania publikacji stanowiących podstawę dysertacji oraz fakt, że we wszystkich tych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, składam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Warszawa 10 luty 2018



Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło