Prof. dr hab. Elżbieta Brzezińska,
Zakład Chemii Analitycznej
Katedry Chemii Medycznej
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Łódź, 2019-05-05

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych,
autorstwa mgr Justyny Godyń
pt.: „Badanie właściwości biochemicznych i fizykochemicznych nowych ligandów wielofunkcyjnych o potencjalnym wpływie na procesy neurodegeneracyjne" wykonana w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedry Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego *Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego* w Krakowie.

Przedłożona do oceny praca liczy 87 strony maszynopisu, do których dołączono 6 kopii publikacji naukowych, z udziałem Doktorantki. W opracowaniu zacytowano 118 prac źródłowych bibliografii z okresu lat 1961-2019. Tekst uzupełniają ułatwiające odbiór elementy – *Lista skrótów* stosowanych w pracy i *Streszczenie*. Dodano też krótkie streszczenie w języku angielskim. W mojej opinii tekst jest pełny i nie wymaga uzupełnień. Zbiór publikacji dołączonych do opracowania, połączony jest z tematem doktoratu. Prace powstały z udziałem 3-15 współautorów. Pani mgr Godyń jest pierwszym autorem trzech prac. Do opracowania dołączono zbiór oświadczeń współautorów prezentowanych publikacji dotyczących udziału w realizacji badań.

Przedstawione badania stanowią część składową szerokiego projektu naukowego dotyczącego poszukiwania związków o potencjalnym charakterze ligandów wielofunkcyjnych i przewidywanej aktywności względem wybranych celów biologicznych. W zakresie pracy doktorskiej wykonano badania biochemiczne *in vitro* i fizykochemiczne 120 związków chemicznych. Określono ich zdolność hamowania enzymów: acetylocholinoesterazy, butyrylocholinoesterazy i beta-sekretazy. Zbadano kinetykę reakcji enzymatycznej cholinoesteraz i powinowactwo wybranych inhibitorów do tych enzymów. W badaniach fizykochemicznych oszacowano optymalne wartości log P dla przenikania związków do OUN. Lipofilowość 49 przypadków badano techniką micelarnej chromatografii elektrokinetycznej. Badano też zdolność przenikania BBB stosując elektrochromatografię kapilarną z użyciem kapilary powlekanej warstwą liposomów. Optymalizowano warunki parametrów doświadczenia. Oceniono statystycznie korelację wyników analizy

i biodostępność OUN+/- 26 znanych leków. W badaniach strukturalnych nowych związków, po analizach biochemicznych i fizykochemicznych, wytypowano strukturę wiodącą do dalszej optymalizacji.

Wprowadzeniem do pracy jest zwięzły opis podstaw teoretycznych prowadzonych badań (*Wstęp*). Doktorantka zawarła tu podstawowe informacje na temat: zasady działania ligandów wielofunkcyjnych i ich zalet w terapii chorób o złożonej patogenezie, a wśród nich w terapii choroby Alzheimera; rozwoju badań w poszukiwaniu nowych, skutecznych oraz aktualnie funkcjonujących leków w terapii tej choroby; etiologii choroby Alzheimera i poszukiwań w zakresie możliwości terapii, z równoczesnym wskazaniem i uzasadnieniem wyboru celów biologicznych dla projektowanych ligandów; aktualnego stanu badań nad możliwościami terapeutycznymi, związanymi z przyczynami powstawania objawów; strategii modelowania ligandów wielofunkcyjnych i analizy ich profilu farmakologicznego. Tak skonstruowane wprowadzenie teoretyczne, mimo krótkiej formy, zawiera wszystkie ważne dla pracy elementy i pełne uzasadnienie prowadzonych prac.

Realizację tematu rozpoczęto od badań biochemicznych ligandów wielofunkcyjnych, zaprojektowanych i syntezowanych w Zakładzie Fizykochemicznej Analizy Leku UJCM. Badania przeprowadzono na trzech seriach wybranych pochodnych benzyloaminy lub fenyloetyloaminy, farmakoforów odpowiedzialnych za interakcję z centrum aktywnym cholinoesterazy. W grupie I znalazło się 30 pochodnych ftalimidu i sacharyny oraz amin alicyklicznych o spodziewanym działaniu hamującym enzymy cholinoesterazy, agregację beta-amyloidu i beta-sekretazę. W II grupie znalazły się związki projektowane na podstawie analizy grupy I. W sposób planowy wprowadzono liczne zmiany strukturalne i modyfikacje podstawników. Zsyntezowano i zbadano 15 pochodnych ftalimidu i 2-hydroksyetloaminy z założeniem działania hamującego cholinoesterazy, agregację beta-amyloidu i beta-sekretazy. III grupa to 24 pochodne 2-hydroksyetyloaminy, 3-hydrokypropyloaminy i różnych reszt aminowych. Ich budowa jest wynikiem kolejnych modyfikacji struktury aktywnych pochodnych. Dla tych związków przewidywano potencjalną zdolność hamownia wymienionych enzymów oraz białka tau. Fragmenty strukturalne wszystkich trzech grup zostały połączone z możliwością oddziaływań z elementami aktywnymi wytypowanych celów biologicznych. Pozwoliło to uzasadnić, wybrane do badań biochemicznych kolejne związki i użyte testy biochemiczne. Zastosowano spektrofotometryczny test Ellmana, który uwidocznia obniżenie aktywności cholinoesteraz, w reakcji z acetylocholiną lub butyrylocholiną i poziomu produktu – tiocholiny. Zastosowana metoda analityczna jest znanym sposobem oceny inhibitorów tych enzymów. Badanie przeprowadzono dla

wszystkich związków grup I-III. Podobnie, wszystkie związki poddano badaniu w technologii przeniesienia energii rezonansu fluorescencji. Pod wpływem działania inhibitorów ludzkiej beta-sekretazy, efekt fluorescencji modyfikowanego fragmentu APP – substratu beta-sekretazy – zmniejsza się. W obu testach zbadano wszystkie związki. Przeprowadzono analizę regresji i wyznaczono wartości IC_{50} dla najlepszych przypadków.

Badano również aktywność antyagregacyjną związków. Zastosowano fluorymetryczny test tioflawinowy T. Agregaty liniowe fibryli beta-amyloidu i agregaty białka tau oddziałują z tioflawiną T i wykazują fluorescencję. Badanie te prowadzono we współpracy międzynarodowej (Słowenia i Hiszpania).

Analiza wyników badań związków I grupy przyniosła wnioski dotyczące optymalizacji struktury w planowaniu ligandów wielofunkcyjnych. Część wskazań do zmian i proponowanych podstawników okazała się skuteczna i przyniosła poprawę działania, większą selektywność i hamowanie agregacji amyloidu beta oraz białka tau. Wszystkie wprowadzone zmiany w budowie związków zostały uzasadnione, skomentowane i wyjaśnione. Dzięki planowemu działaniu wyłoniono nową, obiecującą strukturę do dalszego opracowania. Związek ten łączy aktywność w zakresie wszystkich celów biologicznych, jako najlepszy przykład liganda wielofunkcyjnego, potencjalnie zmniejszający objawy neurodegeneracji.

Kinetykę reakcji enzymatycznych badano dla wiązania dwóch najlepiej rokujących pochodnych. Badanie, wykonywane z zastosowaniem testu Ellmana, ze zmiennym stężeniem substratu (acetylocholiny i butyrylocholiny), w obecności inhibitora, pozwoliło na określenie typu inhibicji. Badania te udokładniły założenia i pierwotne obserwacje. Pozwoliły one na stwierdzenie dla jednej pochodnej niekompetycyjnego, odwracalnego typu inhibicji *ee*AChE. Działanie to jest charakterystyczne również dla donepezilu (interakcja głównie z PAS z możliwością hamowania agregacji beta-amyloidu). Związek, powstały w wyniku modyfikacji strukturalnej, określono jako odwracalny, mieszany typ inhibicji *eq*BuChE – częściowo kompetycyjny i niekompetycyjny.

Doktorantka opisuje doświadczenie badania kinetyki reakcji enzymatycznych przedstawiając interpretację wyników i wnioski z widoczną znajomością przebiegu i znaczenia tej analizy.

Uzupełnieniem charakterystyki potencjalnych ligandów wielofunkcyjnych, o potencjalnym wpływie na procesy neurodegeneracyjne, były badania ich właściwości fizykochemicznych. Pani Magister, w sposób krótki i przejrzysty, przedstawiła znaczenie parametrów fizykochemicznych (szczególnie lipofilowości) w ustalaniu potencjalnego działania biologicznego i właściwości farmakokinetycznych. Zaprezentowano również krótki

przegląd metod analitycznych stosowanych w badaniu lipofilowości oraz zalety użycia w tym celu elektroforezy kapilarnej w formie chromatografii elektrokinetycznej EKC. Prezentacja większości metod badania lipofilowości wskazuje na dobrą znajomość tego warsztatu analitycznego i możliwość dostosowania warunków doświadczenia do potrzeb przedmiotu badań. W badaniach własnych Doktorantka wykorzystała metodę EKC w wariancie micelarnej chromatografii elektrokinetycznej MEKC, porównując uzyskane dane z wynikami metody referencyjnej (RP-TLC), wartościami metod obliczeniowych i ustalonym wcześniej działaniem biologicznym. Badania są logicznie zaplanowane i obszerne. Oszacowano lipofilowość 49 badanych związków, parametru fizykochemicznego istotnie wpływającego na losy leku w organizmie (choć nie jedynego). Interesujące jest ustalenie w wyniku badań optymalnego zakresu parametru log P potencjalnych ligandów AChE i BuChE. Optimum to znalazło się w zakresie rekomendowanym dla biodostępności w OUN.

Naturalną konsekwencją tych wniosków były podjęte próby stworzenia modelu analitycznego przenikania bariery krew-mózg BBB. Pani Magister podjęła próbę opracowania innowacyjnej metody badania opartej na technice elektrochromatografii kapilarnej, w której kapilara pokryta jest od wewnątrz warstwą liposomów modyfikujących fazę stacjonarną. W przebiegu doświadczenia Doktorantka wypracowała optymalne warunki rozdziału związków referencyjnych i badanych. Otrzymane wyniki zostały porównane z danymi z oznaczeń *in vivo* i *in vitro*, opracowane statystycznie oraz przeanalizowane. Dużym sukcesem stało się stwierdzenie lepszej korelacji wyników badań *in vivo* (log BB) i danych log k uzyskanych w doświadczeniu, niż korelacja wartości log BB i wyników innej metody referencyjnej (PAMPA-BBB). Opracowana metoda pozwoliła również na prawidłową klasyfikację badanych leków, w grupach OUN+ i OUN-, na poziomie porównywalnym z metodą odniesienia. Metoda ma wiele zalet i, zgodnie z deklaracją Doktorantki, badania w tym kierunku będą kontynuowane.

Wszystkie wyniki zostały opisane kolejno, z odniesieniem do prac będących podstawą dysertacji. Liczba przedstawionych tabel i wykresów jest wystarczająca. Te bogate i dobrze zaplanowane doświadczenia są też właściwie udokumentowane, w krótkim i czytelnym opisie. Dyskusja wyników tłumaczy podjęte tezy badawcze i rezultaty przeprowadzonych doświadczeń na tle istniejących przykładów piśmiennictwa cytowanego. Pozwala to na przekonanie czytelnika o trafności wyborów dotyczących zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników. Treść przedstawionego opisu badań i ich wyników potwierdza bardzo

dobre przygotowanie Doktorantki do podjęcia pracy naukowej. Jest świadoma wartości swojej pracy, ale też znaczenia pracy w zespole i swojej w nim roli.

Praca zawiera wiele wątków badawczych prowadzonych z zastosowaniem zróżnicowanych technik. Wykonanie wymagało wielu różnych umiejętności, co należy podkreślić i szczególnie docenić. Opis dokonań własnych w zakresie tematu świadczy o samodzielności w prowadzeniu badań naukowych i szerokich zainteresowaniach Doktorantki.

Wszystkie przedstawione badania, zawarte w przedłożonej do oceny pracy, wykonano i opisano poprawnie z dużą dbałością o szczegóły. Praca napisana jest starannie.

W podsumowaniu stwierdzam, że wybór zakresu badań był celowy a przewidziane zadania zostały zrealizowane. Opis przeprowadzonych doświadczeń jest obiektywny i wystarczająco szczegółowy. Dołączony zbiór publikacji pozwala na osadzenie badań Doktorantki w pracach Zespołu i uznanie ich znaczenia w rozwiązywaniu problemu. Rozprawa zawiera istotne elementy nowości naukowej. Największym osiągnięciem mgr Godyń jest opracowanie innowacyjnej metody badań przenikania przez barierę krew-mózg z zastosowaniem elektrochromatografii kapilarnej, naśladującej warunki fizjologiczne, z osiągnięciem obiecujących wyników.

Uważam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Jej poziom można uznać za wyróżniający.

Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Colegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Justyny Godyń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Brzezińska

prof. dr hab. Elżbieta Brzezińska