

Prof. dr hab. Monika Wujec

Lublin, 22.08.2019

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Matys wykonanej w Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie

W dzisiejszych czasach, gdy postęp nauk jest tak ogromny, wydawać by się mogło, iż wynalezienie skutecznych leków przeciwbakteryjnych, czy też przeciwnowotworowych to tylko kwestia czasu. Niestety nic bardziej mylnego. Człowiek doskonali narzędzia, ale mikroorganizmy i komórki nowotworowe również; i jak dotąd człowiek przegrywa. Zarówno bakterie, jak i komórki nowotworowe wytworzyły mechanizmy oporności, dzięki którym skutecznie bronią się przed lekami. Jednym z takich mechanizmów, wspólnych dla bakterii i komórek nowotworowych, jest usuwanie leków z komórki za pomocą białkowych pomp wyrzutu leków „efflux pumps”. Należą one do różnych rodzin białek transportujących. Posiadają zdolność usuwania z wnętrza komórek praktycznie wszystkich substancji obcych, czyli leków, rozpuszczalników organicznych, detergentów. Logicznym zatem jest poszukiwanie związków chemicznych hamujących aktywność tychże białek. Jest to jedna z najnowszych strategii poszukiwania efektywnych leków zarówno przeciwdrobnoustrojowych, jak i przeciwnowotworowych. Badania tego typu są przedmiotem intensywnych prac prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska wpisuje się w ten nurt badawczy. Opracowana jest w sposób klasyczny. Zawiera wstęp, założenia i cel pracy, opis stosowanych metod i materiałów, omówienie wyników oraz dyskusję. Do pracy dołączono artykuły

zawierające wyniki części badań prezentowanych w rozprawie doktorskiej o łącznym IF 10.955.

W części wprowadzającej autorka przedstawia przegląd literatury na temat mechanizmów oporności drobnoustrojów na antybiotyki oraz oporności komórek nowotworowych na leki cytostatyczne. W sposób szczególny skupia się na mechanizmie usuwania leków z komórki za pomocą pomp wyrzutu leków. Ta część pracy w sposób wyczerpujący uzasadnia trafność podjętej tematyki badawczej. Oparta jest na 130 pozycjach literaturowych, w 95% z bieżącego wieku. Świadczy to dobitnie o aktualności prezentowanej tematyki badawczej.

Jako główne cele pracy mgr Anny Matys można wskazać:

1. Określenie aktywności przeciwbakteryjnej czterech grup pochodnych hydantoiny, zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM oraz zbadanie ich wpływu na działanie wybranych antybiotyków.
2. Oznaczenie zdolności wybranych grup pochodnych hydantoiny do hamowania pompy wyrzutu leków, glikoproteiny P w mysich komórkach chłoniaka transfekowanych ludzkim genem dla *P-pg*.

Do badań mikrobiologicznych użyto szczepy bakterii gram dodatnich – gronkowca złocistego (jeden szczep kliniczny, oporny na oksacylinę HEMSA 5 oraz szczep referencyjny *S. aureus* ATCC 25923) oraz gram ujemnych - pałeczki okrężnicy (izolat kliniczny, oporny na ciprofloksacynę HEMEC 10 oraz szczep referencyjny *E. coli* ATCC 25922). Wyznaczono wartości MIC dla badanych pochodnych oraz dla mieszanin związków z antybiotykami określając w ten sposób wpływ substancji na aktywność antybiotyków. Wśród hydantoin w stosunku do HEMSA 5 najaktywniejsze okazały się chlorowodorki: (Z)-5-(naftalen-2-ylometyleno)-2-piperazyn-1-ylo)-3H-imidazol-4(5H)-onu oraz (Z)-5-(antracen-9-ylometyleno)-2-piperazyn-1-ylo)-3H-imidazol-4(5H)-onu. Zarówno z oksacyliną, jak i kloksacyliną obserwowano bardzo znaczny wzrost aktywności (odpowiednio 128- i 64-krotny oraz 256 i 8-krotny). W związku z faktem, iż związki powodowały wzrost aktywności tylko antybiotyków β -laktamowych, postawiono słuszną hipotezę o zaangażowaniu białek odpowiedzialnych za oporność w stosunku do β -laktamów w mechanizm działania. Założenie zweryfikowano wykonując dokowanie aktywnych związków, antybiotyków oksacyliny i kloksacyliny oraz - celem porównania - nieaktywnego (Z)-5-(fenantren-9-ylometyleno)-2-piperazyn-1-ylo)-3H-imidazol-4(5H)-onu zarówno do MecR1 (Methicillin resistance mecR1 protein), jak i PBP2a (penicillin binding protein 2a). Na podstawie uzyskanych wyników

stwierdzono, iż badane związki silniej oddziałują z miejscem wiążącym białka MecR1 niż PBP2a. Badania w kierunku patogenów bakteryjnych Doktorantka uzupełniła określając toksyczność dla czterech najaktywniejszych pochodnych zarówno *in silico*, jak i *in vitro*. Dwie spośród badanych pochodnych nie wpływało znacząco na żywotność komórek linii HEK-293. Uzyskane wyniki z tej części pracy są bardziej niż zadowolające. Stanowią doskonałą podstawę do dalszych badań.

Drugi kierunek zainteresowań Pani mgr Anny Matys dotyczy aktywności przeciwnowotworowej pochodnych hydantoiny. Do badań użyto mysie komórki chłoniaka transfekowane ludzkim genem *P-pg*. Za pomocą testu akumulacji bromku etydyny sprawdzono zdolność do hamowania pompy wrzutu leków, glikoproteiny P przez 4 wyselekcjonowane grupy pochodnych otrzymanych wcześniej w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM. W przypadku badań mikrobiologicznych, Doktorantka wyczerpująco wyjaśniła dobór związków do badań, natomiast w przypadku badań na linii nowotworowej, brak jest wyjaśnienia skąd pomysł na czwartą grupę?

Na podstawie uzyskanych wyników mgr Matys wyselekcjonowała pochodne z ugrupowaniem fenylpiperazynowym jako najbardziej aktywne pochodne spośród badanych hydantoin.

Rozprawę doktorską wieńczy rozdział traktujący o zależnościach struktury od aktywności. Jest to zwięzła, rzeczowa dyskusja pozwalająca ocenić Recenzentowi zarówno umiejętność interpretacji otrzymanych wyników, jak i ich znaczenie. Muszę przyznać, iż rozdział ten dowodzi wiedzy i opanowania tematu przez Autorkę.

Reasumując, zamierzeniem pracy badawczej mgr Anny Matys było określenie w jakim stopniu związki syntetyzowane w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM mogą stać się lekami, działającymi poprzez hamowanie pompy wyrzutu leków. W mojej opinii cel został osiągnięty. Doktorantka wykazała, iż połączenie pochodnej hydantoiny ze stosowanym antybiotykiem daje ogromne (256razy!) zwiększenie jego siły działania, a co za tym idzie możliwość zmniejszenia dawki leku czy wyższą efektywność. Wskazała również na możliwy mechanizm inhibicji, poprzez wiązanie z białkiem MecR1.

Z drugiej strony wskazała na ważne elementy struktury pochodnych hydantoiny, warunkujące aktywność hamującą w stosunku do pompy wyrzutu leków, wielolekoopornej proteiny 1 (P-gp).

Chciałabym w tym miejscu zwrócić uwagę na wartość praktyczną uzyskanych wyników. Stworzona praca pozwoli na racjonalne kontynuowanie badań w kierunku syntezy nowych pochodnych hydantoiny o ukierunkowanej aktywności biologicznej.

Na koniec uwaga krytyczna. Jako recenzentowi zabrakło mi wskazania, które badania Doktorantka wykonywała osobiście, wobec tego nie da się stwierdzić jaki był jej wkład w powstanie przedstawionej do oceny pracy.

W rozprawie znalazły się drobne błędy redakcyjne:

str.4: figura przedstawiona na tej stronie powinna mieć numer 2 i konsekwentnie wszystkie kolejne powinny być zmienione.

str. 12: autorka pisze o pochodnych piperydyny, nie wskazując przy tym żadnej z nich

str. 15: w ostatnim zdaniu odniesienie jest do nieprawidłowej figury

str. 28: dwa razy powtórzone jest praktycznie to samo zdanie, tyle tylko, że jedno jest z błędem.


str. 81: pomyłony jest szczep bakterii; zamiast *S. aureus* napisane jest *E. coli*.

W mojej opinii umieszczenie wzorów i nazw związków w oddzielnych Tabelach jest niepotrzebne.

Powyższe usterki nie wpływają jednak na moją wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam wysoko, zarówno z uwagi na aktualność tematyki badawczej, jak i wartość praktyczną uzyskanych wyników.

Mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Anny Matys do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie jej tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej

Prof. dr hab. Monika Wujec