

Łódź, 2020 04 06

Ocena
Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Szczepańskiej
pt. „Poszukiwanie nowych ligandów histaminowego receptora H₃ w grupie pochodnych piperazyny”

W ośrodkowym układzie nerwowym histamina uczestniczy w regulacji bardziej złożonych funkcji mózgowych (sen-czuwanie, procesy poznawcze, zachowania żywieniowe), a także uruchamia mechanizmy kompensacyjne w warunkach w warunkach leczenia lub ratowania życia (wstrząs hipowolemiczny, hipoglikemia, odwodnienie). Wszystko to wymaga interakcji histaminy z innymi układami neuronalnymi. Receptory histaminowe H₃ zlokalizowane presynaptycznie na neuronach histaminergicznych (autoreceptorach) lub na innych neuronach neuroprzekaźników (adrenergicznych, serotonergicznych, dopaminergicznych, cholinergicznych) (heteroreceptory) kontrolują uwalnianie i syntezę przechowywanego neuroprzekaźnika. Zatem ligandy receptora H₃ mogą być ważnym narzędziem farmakologicznym umożliwiającym modulację różnych układów sygnalizacyjnych w OUN. Ostatnio dokonał się znaczący postęp w zrozumieniu roli receptora H₃. Na podstawie badań eksperymentalnych wskazano potencjalne terapeutyczne zastosowanie agonistów i antagonistów receptora H₃. W szczególności antagoniści/odwrotni agoniści receptora H₃ mogą stać się przydatnymi lekami do leczenia narkolepsji, padaczki, otyłości, bólu neuropatycznego, schizofrenii lub deficytów pamięci i uczenia się.

Starzejące się społeczeństwa i związany z tym wzrost liczby pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi oraz ogarniająca kraje wysokorozwinięte epidemia otyłości, uzasadniają ze wszech miar celowość poszukiwań selektywnych antagonistów/odwrotnych agonistów receptora H₃ o wysokiej aktywności.

Początkowe poszukiwania bardzo aktywnych antagonistów receptora H₃ ukierunkowane były na strukturalne modyfikacje naturalnego ligandu histaminy. Doprowadziło to do otrzymania szeregu silnych antagonistów receptora H₃ zawierających imidazol w swojej strukturze. Wiele z tych związków znalazło zastosowanie tylko jako użyteczne narzędzia farmakologiczne. Podstawowym problemem związanym z ligandami zawierającymi pierścień imidazolu jest słaba penetracja do OUN, ponieważ imidazol jest silnym akceptorem i donorem wiązania wodorowego. Udowodniono, że pochodne imidazolowe wykazują powinowactwo do izoenzymów cytochromu P450, kompleksując atom żelaza hemu i wpływając na jego inhibicję. Może to objawiać się powstawaniem interakcji lek-lek poprzez wolniejszy metabolizm dwóch jednocześnie podanych leków, hepatotoksycznością, objawami pozapiramidowymi, zahamowaniem syntezy steroidów kory nadnerczy.

Z tego powodu, wiele laboratoriów na całym świecie, w tym Zakład Technologii i Biotechnologii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego, podjął wyzwanie zaprojektowania i syntezy wysoce silnych i selektywnych nie-imidazolowych ligandów histaminowego receptora H₃, które łatwo przedostają się do mózgu i nie zakłócają metabolizmu endogennych związków i ksenobiotyków.

Głównym celem tej pracy było uzyskanie serii nowych, aktywnych i selektywnych ligandów receptora histaminowego H₃, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych właściwości fizykochemicznych i parametrów ADMET. Jako związki wiodące wybrano dwie pochodne piperydyny DL76 i DL77 - wcześniej zsyntetyzowane w Departamencie Technologii i Biotechnologii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - do dalszych modyfikacji strukturalnych. Ww. związki wiodące posiadały wysokie powinowactwo i selektywność wobec receptora H₃, a także obiecujący farmakologiczny profil przeciwdrgawkowy i pro-kognitywny w badaniach przeprowadzonych na gryzoniach.

Rozprawa doktorska Katarzyny Szczepańskiej opisuje badania z zakresu chemii medycznej przeprowadzone przy użyciu powszechnie uznanych metod projektowania substancji o potencjalnym działaniu biologicznym.

Praca doktorska Katarzyny Szczepańskiej jest dobrze skonstruowana i poprawnie przedstawiona. Składa się z 8 głównych rozdziałów napisanych w języku angielskim, z których pierwszy i drugi rozdział (Wprowadzenie i Założenia pracy) zawiera przegląd dotyczący działania histaminy, funkcji receptora H₃ i jego ligandów. Taki dobór, omówionej grupy tematów, jest głęboko uzasadniony. Pozwala bowiem umiejscowić prace doświadczalne Doktorantki na tle osiągnięć w dotychczasowych badaniach nad poszukiwaniami nie-imidazolowych antagonistów receptora H₃ i jest oparty na danych z 85 pozycji literaturowych.

W rozdziale 3. (Cel badań) i 4. (Metody badań) doktorantka opisuje cele swojej rozprawy doktorskiej i sposoby ich realizacji

a) Projektowanie ligandów wsparte modelowaniem molekularnym opartym na znanej strukturze aktywnych pochodnych

b) Synteza nowo zaprojektowanych związków chemicznych obejmująca trzy główne modyfikacje ogólnej struktury przedstawione w Tabeli 2., tj. - zastąpienie pierścienia piperydynowego różnymi 4*N*-heterocyklicznymi podstawionymi grupami piperazyny; wydłużenie długości łańcucha alkilowego od 2 do 8 grup metylenowych; wprowadzenie różnych substancji, takich jak metyl, etyl, fenyl, benzoil w pierścieniu aromatycznym we „wschodniej części” związku.

Ostatnie lata przyniosły szereg artykułów przeglądowych na temat nie-imidazolowych ligandów histaminowego receptora H₃ i ich właściwości chemicznych, farmakologicznych oraz badań przedklinicznych. Chociaż wiele aktywnych związków osiągnęło zaawansowane badania kliniczne, to jednak część z nich została odrzucona z powodu działań niepożądanych i/lub właściwości fizykochemicznych. W tych testach nie-imidazolowe ligandy receptora H₃ prowadziły między innymi do;

- fosfolipidozy,
- interakcji lek-kanal HERG
- słabej penetracji (bariera krew-mózg) BBB
- słabych właściwości farmakokinetycznych
- interakcji cytochromu P450

Uwzględniając możliwe, powyższe działania niepożądane, dla najbardziej aktywnych związków w każdej serii, przeprowadzono następujące badania::

- c) - wszystkie nowo zsyntetyzowane związki przetestowano w badaniach *in vitro* względem receptora H₃. W celu potwierdzenia ich selektywności określono również powinowactwo do receptorów histaminowego H₁, dopaminowego D₂, muskarynowego M₁ i adrenergicznego α₁
- przeprowadzono charakterystykę funkcjonalną w celu ustalenia, czy najbardziej aktywne związki z każdej serii są antagonistami, odwrotnymi agonistami i/lub częściowymi agonistami
 - określono takie wybrane parametry ADMET jak

stabilność metaboliczna dla wybranych związków została wstępnie zbadana za pomocą narzędzia obliczeniowego MetaSite,

profil przepuszczalności - dla wybranych związków ich zdolność do przenikania przez błony lipidowe oszacowano za pomocą równoległego testu przepuszczalności błony sztucznej

hepatotoksyczność – dla wybranych związków zbadano in vitro potencjalną aktywność antyproliferacyjną przy użyciu komórek HepG2

ryzyko fosfolipidozy - do przewidywania potencjalnego PLD wybranych ligandów z drugiej serii zastosowano zestaw LYSOD-ID Red Detection

wpływ na aktywność cytochromu P4503A4 - aby ocenić potencjalne ryzyko interakcji lek-lek najbardziej aktywnych ligandów z zsyntetyzowanych serii wykorzystano test CYP3A4P450-GloTM oparty na luminescencji,

d) Analizę SAR nowo otrzymanych pochodnych piperazyny oraz identyfikację najbardziej aktywnych i selektywnie działających związków do testu in vivo

Rozdział 5 (Wyniki i dyskusja) stanowi najobszerniejszą część rozprawy, w której Doktorantka jasno i wyczerpująco prezentuje wyniki badań opartych na recenzowanych publikacjach w European Journal of Medicinal Chemistry, Bioorganic & Medicinal Chemistry oraz Bioorganic Chemistry, które Katarzyna Szczepańska streściła krótko w rozdziale 6 (uwagi końcowe).

Niniejsza praca doktorska oparta jest na czterech artykułach eksperymentalnych i wynikach badań z nieopublikowanej serii związków oraz jednym artykule przeglądowym. Artykuły te opublikowano w czasopismach międzynarodowych (suma IF = 19,409). Do obszernie i szczegółowo omawianych wyników, zostały dołączone kopie oryginalnych artykułów wraz z materiałami informacyjnymi. W czterech z pięciu artykułów Katarzyna Szczepańska jest pierwszą autorką, co świadczy o Jej wiodącym wkładzie w koncepcję projektu, wykonanie eksperymentów, interpretację uzyskanych wyników i w przygotowanie w każdego artykułu.

Dowodzi to, że Katarzyna Szczepańska jest pracownikiem naukowym o wysokich kwalifikacjach, które predysponują Ją do tytułu doktora

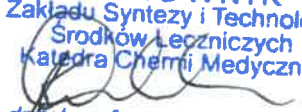
Niewątpliwym osiągnięciem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest synteza dziesięciu bardzo aktywnych związków z otrzymanej grupy osiemdziesięciu pochodnych. Związkiem, który charakteryzuje się najwyższym powinowactwem do receptora H₃ jest pochodna 77. Analiza SAR i modelowanie komputerowe wykazały, które modyfikacje fragmentów związków wiodących wpłynęły na wzrost aktywności.

Podsumowując, główne cele pracy zostały spełnione. Wyniki są dobrze przedstawione, a ich interpretacja jest na wysokim poziomie naukowym. Wszystkie eksperymenty są dobrze zaplanowane i przeprowadzone, a techniki i metody pomiarowe zostały prawidłowo zastosowane.

Mam jednak kilka uwag i komentarz związanych z tekstem w artykule „KSK-19 - Novel histamine H₃ receptor ligands reduce body weight induced obese mice”.

Jeśli dobrze rozumiem, autorzy spodziewali się, że związek KSK19 o znaczących właściwościach antagonistycznych w stosunku do receptora H₃, przekraczając barierę krew-mózg, zablokuje receptory H₃ co spowoduje uwalnianie histaminy, a ta poprzez działanie na receptory H₁ spowoduje utratę apetytu, co doprowadzi do zmniejszenia przyjmowania pokarmu a w efekcie do zmniejszenia masy ciała. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że związek KSK19 po wielokrotnym podaniu zmniejszył masę ciała. Wiele laboratoriów bada wzrost poziomu histaminy za pomocą mikrodializy in vivo. Czy planuje się przeprowadzenie tego typu eksperymentu dla związku KSK19?. Byłby to mocny dowód na aktywność tego związku in vivo.

Moim zdaniem recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania postawione teżom mającym na celu uzyskanie stopnia doktora i pokazuje zdolność Doktorantki do krytycznego myślenia i pracy naukowej w zespole w dziedzinach chemii organicznej, biochemii i farmakologii. Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, aby zaakceptowała rozprawę „Poszukiwanie nowych ligandów receptora histaminę H₃ w grupie piperazyny” i pozwoliła Pani Katarzynie Szczepańskiej na publiczną obronę doktoratu

KIEROWNIK
Zakładu Syntezy i Technologii
Środków Leczniczych
Katedra Chemii Medycznej

prof. dr hab. n. farm. Krzysztof Walczyński