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

Lublin, 8.04.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Pańczyk pt. „Poszukiwanie związków o potencjalnej aktywności ośrodkowej w grupie pochodnych aminoalkanoli i piperazyny" wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego CM UJ w Krakowie od wielu lat prowadzone są badania nad poszukiwaniem nowych substancji o działaniu ośrodkowym. Zapoczątkował je wybitny naukowiec prof. Henryk Marona i jak widać kontynuuje je z powodzeniem dr hab. Anna Waszkielewicz, promotor przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Pani Katarzyny Pańczyk.

Praca doktorska Pani Katarzyny Pańczyk opracowana jest w sposób typowy dla rozpraw doktorskich, z klasycznym podziałem na rozdziały: wprowadzenie, założenia i cel pracy, badania własne, podsumowanie i wnioski, część doświadczalną, literaturę, wykaz zastosowanych skrótów i symboli, wykaz tabel, rycin, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz aneks, stanowiący 3 publikacje współautorstwa Doktorantki, które zawierają część badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Pańczyk liczy 136 stron tekstu, w których zawartych jest 25 rycin oraz 19 tabel. Rysunki i schematy umieszczono w tekście, co ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Praca napisana jest bardzo dobrze pod względem językowym i stylistycznym. Doktorantka posługuje się zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Piśmiennictwo jest właściwie dobrane i cytowane, liczy aż 292 pozycje!

We wprowadzeniu Doktorantka zwięźle omawia udział wybranych struktur w patofizjologii i terapii padaczki, bólu neuropatycznego, depresji i lęku, zawężając do celów molekularnych, stanowiących cel badań własnych tj. układu serotoninergicznego, noradrenergicznego, dopaminergicznego, receptorów δ oraz receptorów μ–opioidowych.

Celem rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Pańczyk było otrzymanie nowych związków, pochodnych aminoalkanoli oraz pochodnych piperazyny o aktywności przeciwdrgawkowej, przeciwbólowej, przeciwdepresyjnej oraz przeciwlękowej. Ponadto, Doktorantka jako cel pracy wymienia także poszerzenie wiedzy na temat zależności pomiędzy strukturą a aktywnością w badanych grupach pochodnych oraz określenie możliwego mechanizmu działania nowowotrzymanych związków, jak też bezpieczeństwa ich możliwego stosowania.

W pierwszym etapie pracy Doktorantka, na podstawie wyników wcześniejszych badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Bioorganicznej a także na podstawie określenia kilku parametrów fizykochemicznych (reguła Lipińskiego) przy pomocy platformy Molinspiration, zaprojektowała struktury nowych związków. Kolejnym etapem była synteza prowadząca do otrzymania 70 nowych pochodnych, różniących się podstawnikami w pierścieniu fenylowym, długością linkera oraz budową komponenty aminowej. Substratami do poszczególnych syntez były pochodne fenolu, które w reakcji z 2-chloroetanolem, 3-chloropropanolem, 4-chlorobutanolem oraz 2-(2-chloroetoksy)etanolem dały pochodne fenoksyalkanolowe oraz fenoksyetoksyetanolowe. Następnie w reakcji z bromkiem fosforu(III) Doktorantka otrzymała odpowiednie bromki, które w reakcji z aminoalkoholami pozwoliły na otrzymanie związków finalnych. Pochodne piperazynowe otrzymano w reakcji bromków lub chlorków kwasów fenoksyoctowych z pochodnymi piperazyny. Wszystkie reakcje prowadzono stosując klasyczne metody syntezy organicznej, uzyskując dobre wydajności poszczególnych procesów. Powyższy opis, w żaden sposób nie oddaje ilości pracy włożonej w otrzymanie tytułowych pochodnych. Na papierze wszystko wygląda bardzo prosto, ale tylko ten kto sam zajmuje się otrzymywaniem nowych połączeń wie ile czasu, energii, często złości (bo znowu nie wychodzi a powinno) wymaga synteza organiczna.

Strukturę wszystkich otrzymanych związków Doktorantka potwierdziła metodami spektralnymi. Czystość i jednorodność za pomocą chromatografii cienkowarstwowej i analizy widm LCMS. Dla enancjomerów związków chiralnych wykonano pomiar skręcalności właściwej. Dziwi trochę fakt wykonania widma IR dla związku 64, po tym jak wykonano

widmo ^{19}F NMR. Rozumiem przesłanki do dokładnego sprawdzenia związku zobaczywszy opis ^{1}H NMR, ale IR w moim odczuciu był już zbyteczny.

Wszystkie otrzymane związki zostały przekazane do badań farmakologicznych w kierunku aktywności przeciwdrgawkowej. Wykonano badania *in vivo*, które obejmowały test maksymalnego wstrząsu elektrycznego (MES) oraz ocenę neurotoksyczności w teście obracającego się pręta (rotarod). Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka ustaliła pewne zależności pomiędzy strukturą a aktywnością w badanych grupach związków, które zostały sprecyzowane w rozdziale Podsumowanie i wnioski. 27 związków spośród pochodnych aminoalkanoli wykazywało znaczącą aktywność przeciwdrgawkową w teście MES. Jeden z nich 2-[2-(2,3,5-trimetylofenoksy)etylo]aminocykloheksanol (związek numer 5) charakteryzował się niską wartością ED_{50} oraz wysokim indeksem terapeutycznym. W dalszym etapie pracy Autorka wytypowała cztery związki do badań w kierunku aktywności przeciwbólowej w bólu neuropatycznym. Do badań wykorzystano 2 modele bólu neuropatycznego: indukowany oksaliplatyną oraz streptozocyną. Ten sam związek – 2-[2-(2,3,5-trimetylofenoksy)etylo]aminocykloheksanol wykazał aktywność analgetyczną we wczesnej fazie bólu neuropatycznego wywołanego oksaliplatyną. Dla aktywnych 4 związków zbadano także aktywność antyoksydacyjną metodą mikropłytkową przy użyciu wolnego rodnika DPPH. Żaden z testowanych związków nie wykazał aktywności. Celem określenia możliwego mechanizmu działania nowootrzymanych pochodnych wykonano badania powinowactwa wobec receptorów $5\text{-}HT_{1A}$. Zaobserwowano brak wiązania lub niskie powinowactwo rzędu 1000 nM. Kolejno wykonano badania dla pochodnych piperazyny, jak pisze Doktorantka, dla wszystkich zsyntetyzowanych pochodnych. Być może coś przeoczyłam, ale testy MES wykonano dla 4 spośród 13 pochodnych. Tylko jedna spośród 4 pochodnych wykazała aktywność przeciwdrgawkową, niestety również wysoką neurotoksyczność. Wyniki badań *in vivo* w kierunku aktywności przeciwlękowej i przeciwdepresyjnej wskazują, iż 2 pochodne piperazyny wykazują statystycznie istotną aktywność przeciwlękową i jedna przeciwdepresyjną. Wszystkie pochodne piperazyny zostały poddane badaniom pod kątem powinowactwa do szeregu receptorów: serotoninergicznych $5\text{-}HT_{1A}$, $5\text{-}HT_{2A}$, HT_6, HT_7, adrenergicznych α_1 i dopaminergicznych D_2. Wyniki badań wskazują na właściwości antagonistyczne niektórych pochodnych w stosunku do wybranych typów receptorów.

Podsumowując ten rozdział pracy stwierdzam, iż wykonano bardzo dużo eksperymentów, w zasadzie wyczerpująco świadczących o aktywności przeciwdrgawkowej oraz dających możliwość dalszych badań w kierunku aktywności ośrodkowej.

Kolejnym etapem pracy badawczej była próba ustalenia możliwych dróg biotransformacji nowootrzymanych pochodnych. Badania przeprowadzono dla dwunastu wybranych aktywnych związków przy użyciu mysich mikrosomów wątrobowych. Wykazano, że metabolizm badanych pochodnych polega na reakcji hydroksylacji grup metylowych, będących podstawnikami w pierścieniu fenylowym lub hydroksylacji samego pierścienia aromatycznego.

Dodatkowo, przeprowadzono również badania bezpieczeństwa otrzymanych pochodnych. Oszacowano potencjalną toksyczność *in silico*, wykorzystując dwa programy: Osiris Propert Explorer oraz Lazar. Celem weryfikacji otrzymanych wyników dla wybranych związków wykonano badania bezpieczeństwa *in vitro*, obejmujące aktywność mutagenną, cytotoksyczność oraz bezpieczeństwo w stosunku do flory bakteryjnej. Wyniki tych badań wskazują, iż niektóre z pochodnych wykazują działanie cytotoksyczne i mutagenne natomiast wszystkie badane związki są bezpieczne w stosunku do flory jelitowej.

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane a osiągnięte wyniki stanowią istotny wkład w poszukiwanie nowych związków o aktywności ośrodkowej. Opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania świadczy o dużej wartości wykonanych badań. Wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań przyczynią się do rozwoju chemii medycznej pochodnych aminoalkanoli i pozwolą na racjonalne projektowanie nowych pochodnych w tejże grupie.

W zasadzie nie mam uwag krytycznych. Ale…

- Jak to bywa przy tak obszernych opracowaniach, Autorka nie ustrzegła się błędów stylistycznych i językowych, choć jest ich bardzo niewiele. W ramach ćwiczenia wzrokowego proszę je znaleźć. Znajdują się na stronach 6, 13, 25, 30, 81.
- W omówieniu wyników badań farmakologicznych dla pochodnych aminoalkanoli Doktorantka ominęła związki z łącznikiem zawierającym trzy atomy węgla, dlaczego? Czy powodem jest zbyt mała liczba związków, aby udało się zaobserwować jakiekolwiek zależności?
- Str.78: nazwa metabolitu felbamatu lepiej brzmi aldehyd 2-fenylo-prop-2-enowy lub jeszcze prościej 2-fenylo-prop-2-en-1-al

- Brakuje mi nazw związków w Rozdziale V. Zdecydowanie łatwiej analizuje się dane widząc nazwę.
- Doktorantka nie umieściła również danych na temat wydajności prowadzonych syntez.

Reasumując, przedstawioną do oceny rozprawę doktorską mgr Katarzyny Pańczyk pt. „Poszukiwanie związków o potencjalnej aktywności ośrodkowej w grupie pochodnych aminoalkanoli i piperazyny" oceniam bardzo wysoko, uważam ją za nowatorską oraz niezwykle interesującą, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Radzie Dyscypliny w dziedzinie nauk farmaceutycznych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Katarzyny Pańczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.