POLITECHNIKA ŁÓDZKA
INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ
Żeromskiego 116, 90-924 Łódź,
Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska,
tel: 42-631-32-61; e-mail: beata.kolesinska@p.lodz.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Jakuba Schabikowskiego

Magister Jakub Schabikowski swoją pracę doktorską zatytułowaną „Poszukiwanie nowych ligandów adenozynowych i inhibitorów MAO-B w grupie pochodnych ksantyn" wykonał na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką prof. dr hab. Katarzyny Kieć-Kononowicz.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie dotyczy projektowania, syntezy i sprawdzenia aktywności biologicznej pochodnych ksantyn. Pochodne ksantyn były tak konstruowane, aby znaleźć związki zdolne do oddziaływania na receptory adenozynowe oraz posiadały zdolność hamowania aktywności MAO-B.

Adenozyna jest naturalnym ligandem receptorów adenozynowych. Wyróżniono dwie rodziny receptorów purynowych: P1, których naturalnym agonistą jest adenozyna (AR) oraz P2, które rozpoznają głównie ATP. Receptory adenozyny dzielone są na cztery podtypy: A_1, A_{2a}, A_{2b} i A_3. Adenozyna charakteryzuje się różnorodną aktywnością biologiczną. odgrywa ważną rolę w wielu procesach biochemicznych takich jak: transport energii – jako trifosforan adenozyny (ATP) i difosforan adenozyny (ADP); przekazywanie informacji genetycznej – jako składnik RNA; przekazywanie informacji w transdukcji sygnału – jako wtórny przekaźnik cAMP; neuroprzekaźnik w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN); uczestniczy w reakcjach metylacji jako S-adenozylometionina; reguluje średnicę naczyń jako metabolit ATP – powoduje skurcz naczyń nerkowych i rozkurcz pozostałych łożysk naczyniowych. Jest istotnym metabolitem w autoregulacji krążenia mózgowego oraz przepływu wrotnego przez wątrobę. Adenozyna działa na wiele układów i narządów łącznie z naczyniowo - sercowym, moczowo - płciowym, immunologicznym, oddechowym i nerwowym poprzez specyficzne receptory błonowe. Stosowana jako lek w napadowym częstoskurczu nadkomorowym oraz częstoskurczu z wąskimi zespołami QRS przy zachowanej miarowości rytmu serca. Działa więc rozszerzająco na naczynia krwionośne. Adenozyna jako lek wykazuje wiele działań niepożądanych, jak np. przejściowy blok AV I, II czy III stopnia, przedwczesne pobudzenia komorowe lub nadkomorowe, bradykardię zatokową, tachykardię zatokową. Stąd też szeroko

prowadzone badania nad poszukiwaniem związków selektywnie działających na podtypy receptorów adenozynowych.

Drugim celem molekularnym, na który mają działać projektowane i syntezowane przez Doktoranta związki jest MAO-B. Monoaminooksydaza (oksydaza monoaminowa, MAO) jest enzymem cytozolowym występującym w wielu tkankach. Wyróżnia się dwie izofomy: MAO-A – zlokalizowana w tkance nerwowej, gdzie odpowiada za deaminację serotoniny, adrenaliny i noradrenaliny oraz dopaminy i tyraminy oraz MAO-B wykazująca powinowactwo do fenyloetyloaminy i benzyloaminy oraz dopaminy i serotoniny. Zaburzenia działania tego enzymu prowadzą do chorób afektywnych oraz zaburzeń ciśnienia tętniczego. Inhibitory MAO wykorzystuje się jako leki przeciwdepresyjne, stosowane głównie w leczeniu atypowej depresji. Niektóre są wskazane przy chorobie Parkinsona. Związki te znajdują również zastosowanie w leczeniu takich schorzeń jak niedociśnienie tętnicze, kiedy obserwuje się obniżone stężenie neuroprzekaźników. Inhibitory MAO-B hamują wychwyt zwrotny amin katecholowych w zakończeniach nerwowych, przez co wzrasta stężenie dopaminy w OUN. Inhibitory MAO-B będące lekami to selegilina (Segan, Selgres) stosowana w monoterapii lub w skojarzeniu z lewodopą i karbidopą w chorobie Parkinsona oraz rasagilina, która jest stosowana w monoterapii lub w terapii skojarzonej z lewodopą w chorobie Parkinsona. Już sam wybór celów molekularnych (target) bezsprzecznie wskazują na aktualność kierunku badawczego podjętego przez Doktoranta.

Praca posiada wielopoziomową strukturę dostosowaną do osiągnięcia nadrzędnego celu badań realizowanych w grupie badawczej profesor Katarzyny Kieć-Kononowicz. Opracowanie metody syntezy pochodnych ksantyn oraz zbadanie ich właściwości wymagało realizacji badań wielopoziomowych obejmujących projektowanie struktur, ich syntezę i w końcu badania in vitro i in vivo. Cel główny pracy, czyli badania nad wielokierunkową aktywnością pochodnych ksantyn oraz próba analizy SAR w celu znalezienia elementów strukturalnych otrzymanych związków pod kątem wskazania farmakoforów decydujących o oddziaływaniu z receptorami adenozynowymi i hamowaniu MAO-B, mógł być osiągnięty poprzez realizację wielu celów szczegółowych obejmujących: 1) projektowanie struktur związków w oparciu o struktury wiodące otrzymane w ramach wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Collegium Medicum UJ; 2) otrzymanie nowych związków będących modyfikacją struktur wiodących z wykorzystaniem różnych metod syntezy chemicznej; 3) potwierdzenie tożsamości otrzymanych związków; 4) zbadanie powinowactwa otrzymanych związków do receptorów

adenozynowych; 5) zbadanie aktywności inhibicyjnej otrzymanych związków względem MAO-B; 6) analiza struktura-aktywność.

Recenzowana praca liczy 206 stron oraz nienumerowany dodatek z trzema publikacjami, w których opisane są wyniki stanowiące znaczącą część pracy badawczej. Układ pracy jest klasyczny i obejmuje streszczenie, wykaz skrótów, wprowadzenie, które jest częścią literaturową, cel i zakres pracy, wyniki i dyskusje, część eksperymentalną, literaturę cytowaną, wykaz publikacji Doktoranta oraz spis tabel, rysunków i schematów.

Rozdział pierwszy „Streszczenie" przedstawia w zwięzły sposób zakres zrealizowanych prac badawczych. W rozdziale drugim, Doktorantowi nie udało się uniknąć błędów edytorskich, część nazw została wpisana dużymi literami, brakuje również wyjaśnienia skrótu CCPA. Rozdział „Wprowadzenie" to krótki przegląd literaturowy, w którym Doktorant omawia receptory sprzężone z białkiem G, w tym receptory adenozynowe, monoamimooksydazy, w tym rolę MAO w chorobach neurodegeneracyjnych i stosowane inhibitory MAO. Ostatni podrozdział dotyczy ligandów wielofunkcyjnych w chorobach neurodegeneracyjnych. Rozdział ten jest krótki, liczy 20 stron i zawiera 201 odnośników literaturowych. Pomimo dużego zróżnicowania tematów poszczególnych fragmentów przeglądu literaturowego oraz bardzo zwięzłego opisu, utrzymane jest podporządkowanie wszystkich części składowych nadrzędnemu celowi pracy. Generalnie, pozwala więc to na wystawienie pozytywnej oceny tej części rozprawy. Tu również są drobne błędy edytorskie. Przykładowo: sposób zapisywania nazw ATP, ADP (strona 17) czy GTP (strona 14).

Jeden z fragmentów tej części pracy „Receptory GPCR biorą udział w metabolizmie substancji czynnych zawartych w około 34% leków dostępnych na rynku ... odgrywając istotną rolę w metabolizmie ksenobiotyków" został przedstawiony bardzo ogólnikowo. Proszę o dokładniejsze przedstawienie kwestii udziału GPCR w metabolizmie leków, wskazanie przykładowych leków działających na GPCR oraz omówienie przemiany genów cytochromu P450 pod działaniem GCPR w trakcie publicznej obrony.

Drugi rozdział główny to „Cel i założenia pracy", rozdział ten napisany jest w sposób klarowny. Na pochwałę zasługuje przedstawienie wyników wcześniejszych prac prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych UJCM nad poszukiwaniem ksantyn zdolnych do oddziaływania z receptorami adenozynowymi oraz wstępnych wyników badań nad ich aktywnością inhibitorową względem MAO-B. W sposób bardzo klarowny przedstawione zostały cztery grupy związków, które Doktorant planował otrzymać oraz uproszczony schemat ich syntezy.

Kolejny rozdział to „Wyniki i dyskusja" liczący 54 strony. Pierwszy etap pracy badawczej dotyczył syntezy pochodnych ksantyn, które Doktorant podzielił na pięć grup. Grupę I stanowiły pochodne 1,3-dimetyloksantyny z dobudowanym pierścieniem piperazyny w pozycji 7 i 8. Grupę II stanowiły pochodne 1,3-dibutyloksantyny zawierające reszty amidowe w strukturze. Grupa III została podzielona na podgrupy A-E i stanowiła pochodne ksantyn z podstawnikami: imidazolowym i benzodiazepinowym. Grupa IV wywodziła się z teobrominy poddanej modyfikacji za pomocą tryptaminy oraz 3,4-dimetoksyfenyloetyloaminy. Grupę V stanowiły pochodne ksantyny wywodzące się z 5,6-diaminouracyli i kwasu 4-(p-nitro-fenoksysulfonylo)benzoesowego poddane finalnej cyklizacji pod działaniem polifosforanu trimetylosililu (PPSE). Uzyskane związki zostały zestawione w tabelach 5-10. Ogrom prac eksperymentalnych bez wątpienia zasługuje na wyróżnienie. To czego mi zabrakło we wszystkich tabelach to całkowita wydajność, z jaką otrzymane zostały związki.

Kolejna część tego rozdziału przedstawia wyniki powinowactwa otrzymanych przez Doktoranta związków do receptorów adenozynowych A_1, A_{2A}, A_{2B} i A_3 oraz badań nad ich aktywnością inhibitorową względem MAO-B. Dodatkowo, w rozdziale tym Doktorant podejmuje próby ustalenia zależności struktura-aktywność. Również w tym rozdziale widoczny jest ogrom wykonanych prac badawczych. W moim odczuciu dużo łatwiejsza byłaby analiza uzyskanych wyników powinowactwa do receptorów adenozynowych jak i hamowania MAO-B, gdyby uzyskane dane przedstawione były w formie wykresów. Proszę o wyjaśnienie w trakcie obrony, dlaczego dla związków z grupy III (tabela 13) podane są podwójne dane (np. dla związku JS16003: 0,396 ±0,134 i 56 ±6 at 1 μM). Analizę uzyskanych wyników ułatwiłoby graficzne przedstawienie zależności struktury od aktywności względem receptorów adenozynowych A_1, A_{2A}, A_{2B} i A_3 oraz zdolności hamowania MAO-B.

Ostatnią częścią prac eksperymentalnych były badania in vivo, oznaczanie aktywności przeciw parkinsonowej w teście katalepsji.

Największym osiągnięciem Doktoranta, było wyselekcjonowanie z puli 165 zsyntezowanych związków, z czego 135 związków należało do grupy ligandów wielofunkcyjnych, związku JS16029, który charakteryzował się podwójnym profilem aktywności względem A_{2A} AR (K_i = 71,1 nM) oraz MAO-B (IC_{50} = 4,496 μM). Związek JS19215 charakteryzował się wysoką aktywnością wobec MAO-B, choć jego powinowactwo względem AR było niskie. Z kolei związek JS16003 posiadał wysokie powinowactwo (Ki na poziomie nM) względem receptorów A_{2A} i A_1. Wszystkie trzy wyselekcjonowane związki mogą być strukturami wiodącymi w dalszych badaniach. W grupie związków

ukierunkowanych na działanie na receptor A_{2B} otrzymane pochodne charakteryzowały się bardzo wysoką selektywnością. Najaktywniejszy był związek JH-15100, dla którego K_i = 0,18 nM i co najważniejsze charakteryzował się ponad 1000-krotną selektywnością w porównaniu do innych receptorów adenozynowych.

Podsumowanie badań własnych przygotowane zostało klarownie i nie budzi zastrzeżeń. Zamieszczenie w tekście rysunków znacząco ułatwia śledzenie przedstawionych danych oraz czytanie pracy, w której zostało opisanych aż 165 nowych związków.

Najobszerniejszym rozdziałem jest „Część eksperymentalna" (82 strony). Rozdział ten napisany jest poprawnie. Procedury i protokoły przedstawione zostały w sposób umożliwiający ich odtworzenie. Poprawnie przedstawiona jest również charakterystyka otrzymanych związków. Jedynie, do czego mam zastrzeżenia, to 100% czystość związków. Przy obecnym rozwoju technik analitycznych, chyba nie można powiedzieć, ze związek ma czystość 100%. W kilku miejscach wkradł się żargon, np. pH zasadowe, odczyn jest zasadowy, zaś pH wynosi umownie od 7 do 14, piec mikrofalowy, chyba raczej reaktor mikrofalowy. Zbiór cytowanych odnośników literaturowych obejmuje 228 pozycji.

Podsumowując, wysoko oceniam wybór ambitnego tematu badań, w pełni zgodnego ze współczesnymi kierunkami prac o charakterze podstawowym jak i potencjale aplikacyjnym. Wysoce pozytywnie oceniam zastosowanie zróżnicowanych i nowoczesnych metod badawczych, oraz trudny i interdyscyplinarny charakter wykonanych prac eksperymentalnych. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość wykorzystywania różnorodnych metod syntetycznych, które Doktorant potrafił zaimplementować w badaniach. Umiejętności te wystawiają najlepsze świadectwo gruntownej wiedzy oraz dojrzałości naukowej Doktoranta. Na dorobek publikacyjny mgr Jakuba Schabikowskiego składa się dziewięć publikacji (pozycja 1 na stronie 202, jest publikacją, w której Doktorant nie jest współautorem). Niestety, w rozprawie doktorskiej brakuje informacji o udziale Doktoranta w konferencjach naukowych.

Pozytywnie oceniam rozprawę doktorską mgr Jakuba Schabikowskiego. Wyniki badań są wartościowe i wnoszą znaczący wkład w rozwój nauki. Uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim oraz obowiązujące wymagania ustawowe. W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Jakuba Schabikowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. inż. Beata Kolesińska