UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką
ul. Chodźki 4A (Collegium Pharmaceuticum), 20-093 Lublin
tel. (081) 448 7250

Lublin, 5.07.2023

Ocena pracy doktorskiej
p.t. „Ocena aktywności nowych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny w układzie sercowo-naczyniowym" wykonanej przez
mgr Joannę Knutelską
w Katedrze Farmakodynamiki, Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Zygmunt

Choroby układu krążenia stanowią główną przyczynę zgonów na świecie, znacznie wyprzedzając nowotwory. Choroby sercowo-naczyniowe (CVD), jako przykład chorób cywilizacyjnych, to ogólne pojęcie obejmujące zaburzenia w obrębie serca i/lub układu naczyń krwionośnych, głównie związanych z procesem miażdżycowym. Główne czynniki ryzyka wystąpienia CVD to wysokie ciśnienie tętnicze i wysokie stężenie cholesterolu, jak również cukrzyca, otyłość, palenie papierosów i brak aktywności fizycznej oraz predyspozycje genetyczne. Ocena ogólnego ryzyka wystąpienia tych chorób jest kluczowa zarówno dla prawidłowej profilaktyki, jak i terapii tych schorzeń. Oprócz niezbędnych zmian stylu życia, w przypadku jednej z tych chorób, nadciśnienia tętniczego, dysponujemy skutecznymi lekami, zarówno w mono-, jaki politerapii. Są to m.in. diuretyki tiazydowe, β-adrenolityki, inhibitory konwertazy angiotensynowej czy antagoniści receptora dla angiotensyny II. W niektórych przypadkach nadciśnienia opornego na standardową farmakoterapię mogą być także stosowane α1-adrenolityki (np. doksazosyna,

terazosyna, dawniej prazosyna), zwłaszcza u pacjentów z łagodnym przerostem gruczołu krokowego, gdyż to właśnie te receptory pełnią kluczową rolę w regulacji ciśnienia tętniczego. Receptory metabotropowe sprzężone z białkiem G, jak właśnie receptory adrenergiczne, są obecnie ważnym punktem uchwytu w poszukiwaniu nowych leków skutecznych w CVD i nie tylko.

Oceniana praca doktorska wpisuje się w ten nurt poszukiwań, posiadając niezaprzeczalne walory poznawcze. Celem pracy była ocena aktywności α-adrenolitycznej i działania biologicznego dwunastu nowozsyntezowanych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny celem wyselekcjonowania struktur o potencjale terapeutycznym, w badaniach *in vitro* i *in vivo*. Na podstawie wstępnych wyników (tj. określenia powinowactwa do receptorów adrenergicznych, aktywności wewnętrznej wobec poszczególnych podtypów receptorów α, wpływu na ciśnienie i elektrokardiogram u normotensyjnych szczurów oraz aktywności przeciwarytmicznej w dwóch modelach), Doktorantka wyselekcjonowała cztery związki wykazujące najwyższą spodziewaną aktywność farmakologiczną, które poddała badaniom poszerzonym (w tym przepuszczalność przez sztuczną błonę komórkową w modelu transportu pasywnego *in vitro*, aktywność przeciwarytmiczna w zaburzeniach rytmu izolowanego serca szczura wywołana okluzją i reperfuzją naczynia wieńcowego *in vitro,* działanie przeciwpłytkowe w 3 modelach agregacji płytek krwi *in vitro*, wypływ na ciśnienie krwi i profil węglowodanowy oraz lipidowy szczura w modelu nadciśnienia wywołanego deksametazonem i inne).

Układ dysertacji doktorskiej jest typowy dla tego typu prac – obszerna rozprawa liczy 224 strony i zawiera wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, opis materiałów, odczynników i metodykę, wyniki badań wraz z 49 przejrzystymi i czytelnymi rycinami, dyskusję, wypunktowane wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz aż 483 pozycji prawidłowo dobranego (numerowanego) piśmiennictwa.

Wstęp (30 stron) stanowi przegląd literatury dotyczący ściśle tematyki rozprawy, czyli z jednej strony opisu wybranych chorób układu sercowo-naczyniowego i z drugiej strony receptorów α-

adrenergicznych i ich antagonistów stosowanych w terapii nadciśnienia tętniczego. Dodatkowo, opisy uzupełniono niezwykle starannymi i przejrzystymi rycinami i tabelami. Informacje zawarte we wstępie pracy są bardzo konkretne, związane ściśle z tematyką pracy. Autorka uniknęła tym samym zbytniego rozbudowania tej części dysertacji. Jednocześnie, tak skonstruowany Wstęp stanowi doskonałe podsumowanie istniejącej już wiedzy, a jednocześnie doskonale uzasadnił celowość badań. Jestem pełna uznania dla Doktorantki za tak obszerne i nowoczesne omówienie najistotniejszych zagadnień dotyczących omawianych zagadnień.

Hipoteza robocza i cele badawcze pracy są jasne, konkretne, z wymienieniem zakresu badań wstępnych i poszerzonych ocenianych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny.

W kolejnym rozdziale podane zostały wzory, nazwy chemiczne i symbole badanych struktur i związków odniesienia. Rozdziały „Materiały i odczynniki" oraz „Metodyka" są napisane bardzo dokładnie. Opis procedur i przeprowadzonych analiz statystycznych jest zrozumiały i wyczerpujący. Badania, bardzo pracochłonne i zaawansowane metodologicznie, są zaplanowane niezwykle starannie. Zastosowano także adekwatne metody statystycznej oceny wyników. Umiejętność posługiwania się powyższymi technikami eksperymentalnymi świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki.

Rozmiar samej części doświadczalnej obejmujący zarówno badania podstawowe jaki i poszerzone jest imponujący. Wyniki są przedstawione bardzo klarownie, zarówno jeśli chodzi o analizę statystyczną, jak i ich prezentację na niezwykle starannie wykonanych rycinach, „przyjaznych czytelnikowi" i przejrzystych tabelach. Jest to bardzo mocna część rozprawy, najobszerniejsza, zasługująca na specjalne wyróżnienie, zarówno jej część opisowa, jak i graficzna. Zakres podjętych badań *in vitro* i *in vivo* i ich skala jest bezdyskusyjnym atutem rozprawy.

Dyskusja wyników jest logiczna i wyczerpująca. Doktorantka umiejętnie analizuje wyniki badań wykazując przy tym dużą znajomość wszystkich aspektów obserwowanych zjawisk.

Rozprawę kończy ogólne podsumowanie wyników badań i wnioski sformułowane w 20 punktach. Za najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki uznać można m.in. i) wykazanie różnic w powinowactwie badanych pochodnych do receptora α1-adrenergicznego, a analiza zależności struktura-aktywność wskazała na to, iż za silne wiązanie z receptorem odpowiedzialny jest podstawnik metoksylowy w pozycji *orto* ugrupowania fenylopiperazynowego i długi łańcuch węglowy łączący ten motyw w pozycji 1 rdzenia hydantoiny; jednocześnie, wszystkie badane pochodne wykazały działanie antagonistyczne na ten receptor, z pewnymi różnicami jeśli chodzi o poszczególne jego podtypy; ii) po wyselekcjonowaniu do badań poszerzonych 4 związków o wyraźnym działaniu hipotensyjnym i przeciwarytmicznym w jednym z modeli arytmii, w przypadku trzech wykazano ich dobrą przepuszczalność przez sztuczną błonę komórkową, a w przypadku czterech aktywność przeciwarytmiczną w modelu arytmii wywołanej okluzją i reperfuzją lewego naczynia wieńcowego izolowanego serca szczura, działanie przeciwpłytkowe *in vitro* i dodatkowo działanie hipotensyjne, hipolipeminizujace i hipoglikeminizujace w modelu nadciśnienia wywołanego deksametazonem; potwierdzono także ich działanie antyoksydacyjne; iii) jeden z tych związków MG-15, wykazał korzystny wpływ na funkcje śródbłonka oraz korzystny profil farmakokinetyczny z długim okresem półtrwania po podaniu dootrzewnowym. Ten właśnie związek okazał się najbardziej zasługiwać na uwagę.

Jeśli chodzi o stronę techniczną, graficzną, edytorską i językową, to rozprawa jest bardzo starannie zredagowana, jej język bardzo poprawny, terminologia naukowa prawidłowa. Piśmiennictwo, odpowiednio dobrane i aktualne, zostało zacytowane właściwie. Dowodzi to właściwego warsztatu naukowego Doktorantki i jej przygotowania do redagowania prac naukowych.

Drobne uwagi i pytania, które nasunęły mi się podczas zaznajamiania się z rozprawą doktorską.

1. Zwykle po przeprowadzeniu syntezy nowych pochodnych w oparciu o wiodącą strukturę przeprowadza się prosty skreening farmakologiczno-toksykologiczny nowych związków, celem

m.in. oszacowania ich bezpieczeństwa i toksyczności metodami *in vivo* (np. oznaczanie LD50 lub ED50 w nieinwazyjnych testach na niewielkiej grupie zwierząt laboratoryjnych - myszy lub model zebrafish, postanie dorosłe lub larwy). Określa się w ten sposób podstawowe i potencjalne kierunki działań toksycznych, i co ważne, także zakres/rząd dawek nietoksycznych a potencjalnie skutecznych jako punkt wyjścia do dalszych badań. W pracy nie ma informacji o wykonaniu takich testów, w związku z tym na jakiej podstawie dokonano doboru dawek tych związków przeznaczonych następnie do testów *in vivo* i podań obwodowych szczurom?

2. Wg mojej oceny, wnioski zawarte aż w 20 punktach są zbytnio rozbudowane i nie wszystkie do końca mają charakter właściwych wniosków wypływających z wykonanych doświadczeń. Może mniej istotną informacją jest ta, które związki o jakich symbolach wywoływały dany efekt, ale to, dlaczego akurat te, jakie konkretnie modyfikacje w ich strukturze leżały u podstaw tej aktywności lub jej braku albo różnic w aktywności. Kilka skondensowanych i bardziej konkretnych punktów w tej części rozprawy wystarczyłoby do sformułowania właściwych, konkretnych wniosków podsumowujących i tłumaczących te różnice oraz wyjaśniających także, dlaczego akurat związek MG-15 może być najbardziej obiecujący, jak modyfikacje struktury chemicznej przełożyć się mogą na aktywność i następnie wybór potencjalnych leków.

Powyższe uwagi o charakterze technicznym i dyskusyjnym oczywiście nie mają większego wpływu na wartość merytoryczną ocenianej przeze mnie rozprawy.

W podsumowaniu chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca dotyczy bardzo ważnego, nie do końca poznanego, ale i trudnego tematu badawczego. To bezdyskusyjnie nowatorski projekt badawczy, mający potencjalnie duże znaczenie nie tylko w aspekcie naukowym, ale także klinicznym. Podjęte przez Panią mgr Joannę Knutelską badania pod kierunkiem Pani Promotor, dr hab. Małgorzaty Zygmunt, precyzyjne sformułowanie ich celu, zakresu i sposobu przeprowadzenia doświadczeń podstawowych i poszerzonych uważam za przemyślane. Protokół badań zwraca uwagę starannością przygotowanego planu badawczego. Wysoko oceniam

umiejętności warsztatowe Doktorantki, poszukiwania sposobów rozwiązywania problemów badawczych, korzystania z literatury stanowiącej przedmiot pracy oraz interpretacji wyników. Głównym argumentem przemawiającym za pozytywną oceną niniejszej pracy jest oryginalna konstrukcja przedstawionych badań, bazująca na obszernej wiedzy teoretycznej i warsztacie badawczym, właściwie wykorzystywanych przy konstrukcji kolejnych etapów pracy wg schematu stosowanego w określaniu działań biologicznych nowozsyntezowanych pochodnych. W świetle przytoczonych przez Doktorantkę danych podjęty temat dysertacji jest wysoce uzasadniony i wnosi wiele nowych elementów o charakterze poznawczym, także z możliwością ich wykorzystania w klinice. Całokształt wyników ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji jednoznacznie dowodzi, że badania nad zjawiskami i mechanizmami leżącymi u podstaw poszukiwania nowych leków z grupy antagonistów receptorów α1 są niezwykle istotne i nadal wymagają wzbogacenia. Badając rolę tych receptorów, badacze mogą mieć nadzieję na opracowanie skuteczniejszej farmakoterapii wielu chorób sercowo-naczyniowych w przyszłości.

Konkludując, rozprawę doktorską Pani **mgr Joanny Knutelskiej p.t.** „Ocena aktywności nowych pochodnych 5,5-dimetylohydantoiny w układzie sercowo-naczyniowym", wykonaną w Katedrze Farmakodynamiki, Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie pod kierunkiem **dr hab. Małgorzaty Zygmunt** oceniam bardzo wysoko. Rozprawa spełnia ustawowe warunki o stopniach naukowych i tytule naukowym zawarte w art. 13 Ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). Wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pani **mgr Joanny Knutelskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zważywszy na to, iż rozprawa nie spełnia jednego z wymogów umożliwiającego wnioskowanie o wyróżnienie, tj. nie ma informacji o opublikowaniu wyników lub ich części, przyjęciu pracy do druku lub bycia jej przedmiotem wynalazku, mimo rozmiaru pracy

doświadczalnej i jej nowatorstwa, oryginalności i szczególnych walorów poznawczych, nie mogę dodatkowo wnioskować o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, chociaż zasługuje ona na wyróżnienie.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Farmakologii
z Farmakodynamiką
prof. dr hab. Grażyna Biała