UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Łódź, 2023 09 07

Ocena
Rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Olejarz-Maciej
pt. „ Wielokierunkowe działanie nowych ligandów receptorów histaminowych i adenozynowych" wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Katarzyny Kieć-Kononowicz jako promotora i dr Tadeusza Karcza jako promotora pomocniczego

Od wielu lat Zakład Technologii i Biotechnologii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego, prowadzi badania nad projektowaniem i syntezą potencjalnych ligandów zdolnych do jednoczesnej modyfikacji aktywności kilku celów farmakologicznych w OUN.

Głównym celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było zaplanowanie i przeprowadzenie testów wybranych grup ligandów receptorów histaminowych H_3 i H_4 pod kątem ich wpływu na kilka możliwych wtórnych przekaźników (cAMP, Ca^{2+}, β-arestyna) oraz przeprowadzenie analizy zależności struktura-aktywność, na podstawie której wskazano fragmenty strukturalne odpowiedzialne za ich selektywność funkcjonalną. Ponadto, Doktorantka przeprowadziła badania dla dwóch grup związków - ligandów receptora histaminowego H_3 oraz ligandów receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A} - pod kątem możliwego hamowania MAO-B.

Histamina odgrywa ważną rolę w różnych stanach patofizjologicznych. W tkankach obwodowych histamina jest magazynowana głównie w komórkach tucznych i bazofilach. W stanach alergicznych z tych komórek uwalniana jest histamina, która jest odpowiedzialna za kilka dobrze znanych objawów chorób alergicznych skóry i dróg oddechowych. W błonie śluzowej żołądka uwalnianie histaminy pod wpływem gastryny spełnia ważną rolę fizjologiczną, stymulując komórki okładzinowe do wydzielania kwasu żołądkowego. W OUN histamina jest syntetyzowana w specyficznych neuronach, które są zlokalizowane w jądrze guzowo-sutkowym tylnego podwzgórza. Neurony te docierają do wszystkich głównych obszarów mózgu i biorą udział w różnych ważnych funkcjach fizjologicznych, w tym w regulacji cyklu snu i czuwania, przyjmowania pokarmu, kontroli układu sercowo-naczyniowego, regulacji uczenia się i pamięci. Histamina działa poprzez co najmniej cztery różne podtypy receptorów (H_1, H_2, H_3, and H_4) . Wszystkie receptory histaminowe należą do dużej rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Receptor H_3 został pierwotnie opisany jako autoreceptor, który hamuje uwalnianie histaminy z neuronów histaminergicznych w mózgu. Działanie hamujące wynika z konstytutywnej aktywności receptora H_3. Ponadto wykazano, że receptor H_3 reguluje uwalnianie kilku ważnych neuroprzekaźników (m.in. acetylocholiny, dopaminy, GABA, noradrenaliny, serotoniny), zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym. Ligandy tego receptora są obecnie oceniane pod kątem ich potencjału klinicznego w leczeniu alergii, chorób zapalnych, zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi, choroby Alzheimera, Parkinsona i otyłości.

Ostatnio opisano szereg związków wykazujących obiecujące dwukierunkowe działanie nie tylko wobec receptorów histaminergicznych H_3/H_1, H_3/H_2 czy H_3/H_4, ale również H_3 z niehistaminergicznymi receptorami związanymi z białkiem G oraz H_3 z inhibitorami wychwytu zwrotnego serotoniny i H_3 z inhibitorami enzymów (HMT, ACHE, BuCHE itp.),

które mogą okazać się - po przejściu badań klinicznych - przydatnymi terapeutykami w leczeniu kilku zaburzeń OUN.
Obecność receptorów H_4 wykazano na komórkach tucznych i granulocytach zasadochłonnych (bazofilach), co świadczy o ich udziale w procesie rozwoju stanu zapalnego. Odkryto je również w mechanizmach reakcji alergicznej. Wykazano również, że receptory te zaangażowane są w zjawisko chemotaksji mastocytów i zmiany kształtu eozynofilów, które wraz komórkami tucznymi i bazofilami kontrolują rozwój alergii i astmy. Wielu antagonistów i agonistów receptora H_3 wiąże się również z receptorem H_4, ze względu na znaczną homologię do receptora H_3, która wynosi dla regionów transmembranowych 58%, a ogólne podobieństwo wynosi 35%. Podobnie jak receptor H_3, receptory histaminowe H_4 są sprzężone z białkiem Gi/o. Pobudzenie receptorów powoduje zmniejszenie stężenia cyklicznego adenozyno-3′,5′-monofosforanu (cAMP), co skutkuje aktywacją kinazy białkowej aktywowanej przez mitogen (MAPK) oraz zwiększonym uwalnianiem Ca^{2+}.
Adenozyna oddziałuje na specyficzne receptory zlokalizowane na powierzchni błony komórkowej neuronów. Do chwili obecnej opisano cztery typy receptorów adenozynowych (A_1, A_{2A}, A_{2B} i A_3) przypisując im jako główną funkcję kontrolowanie pobudzenia komórek nerwowych i regulację wydzielania innych neuroprzekaźników. Wszystkie są sprzężone z białkiem G za pośrednictwem których oddziałują na cyklazę adenylową, stymulując bądź hamując jej aktywność. Adenozyna jest również istotna jako neuroprzekaźnik, który reguluje aktywność neuronów, uwalnianie do synaps innych neurotransmiterów, a także wpływa na ich interakcje ze swoistymi receptorami. Receptory adenozynowe są tradycyjnie klasyfikowane na podstawie ich różnicowego sprzęgania z cyklazą adenylową w celu regulacji cyklicznych poziomów AMP. Receptory A_1 i A_3 są sprzężone z białkami $G_{i/o}$, podczas gdy receptory A_{2A} i A_{2B} są sprzężone z białkami $Gs_{/olf}$. Dlatego aktywacja receptorów A_{2A} i A_{2B} zwiększa produkcję cyklicznego AMP, co skutkuje aktywacją kinazy białkowej A (PKA) i fosforylację białka wiążącego cykliczne AMP (CREB). Natomiast aktywacja receptorów A_1 i A_3 hamuje produkcję cyklicznego AMP i zmniejsza aktywność PKA oraz fosforylację CREB. W OUN receptory A_1 są szeroko rozpowszechnione w neuronach w korze mózgowej, hipokampie i móżdżku. W neuronach receptory A_1 są zlokalizowane w regionach synaptycznych, gdzie modulują uwalnianie neuroprzekaźników, takich jak glutaminian, acetylocholina, serotonina i GABA. Receptory A_{2A} mają bardziej restrykcyjną lokalizację w prążkowiu i opuszce węchowej. Receptory te są obecne w neuronach, mikrogleju i oligodendrocytach. Obecność receptorów A_{2A} opisano w kolcach dendrytycznych i regionach postsynaptycznych zwojów podstawy. Receptory te są zlokalizowane w regionach presynaptycznych (w hipokampie), gdzie modulują uwalnianie neuroprzekaźników, takich jak glutaminian, acetylocholina, GABA i noradrenalina. Receptory A_{2B}A ulegają ekspresji na niskim poziomie na komórkach neuronalnych i glejowych, takich jak mikroglej i astrocyty. Niskie poziomy receptorów A_3 są wykrywalne w hipokampie, korze mózgowej, móżdżku i prążkowiu, z lokalizacją komórkową w neuronach, astrocytach i mikrogili.
Oksydazy monoaminowe (MAO) są enzymami, który katalizuje oksydacyjną deaminację amin biogennych. MAO są zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondriów i odgrywają ważną rolę w metabolizmie neuroaktywnych monoamin, takich jak dopamina, norepinefryna, serotonina i melatonina, w mózgu. MAO występuje w postaci dwóch izoenzymów, MAO-A i MAO-B. W szczególności epinefryna, norepinefryna, melatonina i serotonina są metabolizowane głównie przez MAO-A, podczas gdy fenyloetyloamina i benzyloamina są głównie rozkładane przez MAO-B. Oba izozymy mają również zróżnicowane lokalizacje komórkowe w mózgu: MAO-A jest głównie zlokalizowana na zakończeniach aksonów DAergicznych w jądrze nigrostriatalnym, podczas gdy MAO-B jest głównie zlokalizowany w astrocytach i neuronach serotonergicznych. Ze względu na specyficzność substratową selektywne inhibitory MAO zostały zaprojektowane tak, aby hamować aktywność

określonego typu izoenzymu: klorgilina i moklobemid hamują MAO-A, natomiast selegilina, rasagilina i safinamid hamują MAO-B. Większość z tych inhibitorów MAO-A i MAO-B jest różnie przepisywana pacjentom odpowiednio z depresją i chorobą Parkinsona (PD).

Praca doktorska mgr Agnieszki Olejarz-Maciej jest dobrze skonstruowana i poprawnie przedstawiona. Składa się z 5 głównych rozdziałów napisanych w języku angielskim, z których pierwszy rozdział (Wprowadzenie) zawiera przegląd dotyczący strategii w walce ze złożonymi chorobami m.in. OUN, omówienie receptorów sprzężonych z białkiem G jako cel działania leku na przykładzie receptorów histaminowych H_3, H_4 oraz adenozynowych A_1, A_{2A} i inhibitorów MAO-B. Taki dobór, omówionej grupy tematów, jest głęboko uzasadniony. Pozwala bowiem umiejscowić prace doświadczalne Doktorantki na tle osiągnięć w dotychczasowych badaniach nad poszukiwaniami ligandów wykazujących wielokierunkowe działanie i jest oparty na danych z 342 pozycji literaturowych. W rozdziale drugim (Zakres i cele pracy) mgr Agnieszka Olejarz-Maciej opisała plan badań. W podsekcji 2.1. zatytułowanej „Aktywność wewnętrzna ligandów histaminowych ludzkiego receptora histaminowego H_3 i H_4" przedstawiono metody badań aktywności wewnętrznej serii ligandów histaminowych receptorów ludzkich H_3 i H_4 wykorzystujące szlaki możliwych przekaźników wtórnych. Charakterystykę funkcjonalną wybranych ligandów receptora hH_3 przeprowadzono z wykorzystaniem:

A. testu akumulacji cAMP

B. test „wypływu Ca^{2+}"

Natomiast charakterystykę funkcjonalną wybranych ligandów receptora hH_4 przeprowadzono z wykorzystaniem

A. testu akumulacji cAMP

B. testu rekrutacji β-arestyny przy użyciu komplementacji rozszczepionej lucyferazy

C. rekrutacji β-arestyny przy użyciu testu TANGO

W podsekcji 2.2 zatytułowanej „Wielokierunkowa aktywność ligandów ludzkiego receptora histaminowego H_3 i receptorów adenozynowych" zaplanowano i przeprowadzono następujące badania:

1. Hamowanie MAO-B przez ligandy ludzkiego receptora histaminowego H_3

a. wstępne badanie przesiewowe

b. oznaczanie IC_{50} dla związków aktywnych

c. oznaczanie aktywności MAO-A dla najaktywniejszych inhibitorów MAO-B

d. analiza zależności struktura-aktywność dla hamowania MAO-B

e. analiza zależności struktura-aktywność dla dwukierunkowego działania (hH_3 i MAO-B)

2. Hamowanie MAO-B przez ligandy receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A}

a. wstępne badanie przesiewowe

b. oznaczanie IC_{50} dla związków aktywnych

c. oznaczanie aktywności MAO-A dla najaktywniejszych inhibitorów MAO-B

d. analiza zależności struktura-aktywność dla hamowania MAO-B i MAO-A

3. Określenie odwracalności hamowania MAO-B

a. dla ligandów ludzkiego receptora histaminowego H_3

b. dla ligandów receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A}

4. Określenie modalności hamowania MAO-B

a. dla ligandów ludzkiego receptora histaminowego H_3

b. dla ligandów receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A}

W rozdziale trzecim (Wyniki badań i dyskusja) Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki i przeprowadziła ich szczegółową analizę. W podsekcji 3.1. zatytułowanej „Aktywność wewnętrzna ligandów histaminowych ludzkiego receptora histaminowego H_3 i H_4" dla wybranej grupie ligandów ludzkiego histaminowego receptora H_3 - strukturalnie modyfikowanych analogów pitolisantu (oznaczonych jako seria E) – przeprowadzone zostały

badania z wykorzystaniem testu akumulacji cAMP w celu wykazania czy badane związki są agonistami/antagonistami/odwrotnymi agonistami. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wszystkie badane związki są antagonistami i wykazują zarówno wysokie (K_i=8,8 – 25.2 nM) lub znaczące (K_i=228,2 – 358 nM) powinowactwo do receptora H_3 i antagonistyczną aktywność w teście akumulacji cAMP (IC_{50}=2,38 do IC_{50}=162 nM).
Związkami wybranymi do zastosowania w teście „wypływu Ca^{2+}" były ligandy receptora H_3 z serii KSK, gdzie do bazowej struktury 1-(4-pirydylo)piperazyny wprowadzony został, w pozycję 4-piperazyny, łącznik o różnej długości łańcucha ω-oksyalifatycznego (od 2 do 8 grup metylenowych) zawierający podstawniki o charakterze hydrofobowym jak: acetofenon, propiofenon, *p-tert*-butylo- i *p-tert*-amylofenyl. Związki zostały podzielone na dwie grupy. Do pierwszej grupy zostały przypisane związki zawierające te same podstawniki i różniące się długością łańcucha. W drugiej grupie znalazły się związki o tej samej długości łańcucha z różnymi podstawnikami . Związkiem referencyjnym był klobenpropit. W oparciu o analizę wyników powinowactwa do receptora H_3 i aktywności wewnętrznej mierzonej w teście „wypływu Ca^{2+}" otrzymanych pochodnych w serii KSK wykazano, że związki w strukturze których występuje łącznik zawierający trzy grupy metylenowe wykazują najlepsze powinowactwo do receptora H_3 i aktywność wewnętrzną w teście „wypływu Ca^{2+}". Najwyższe powinowactwo do receptora H_3 wykazywała pochodna zawierającą resztę *p-tert*-butylofenylową, ale wyznaczona wysoka aktywność wewnętrzna nie może być przypisana tylko interakcji z receptorem H_3 - wymagane są dalsze badania,
W kolejnym etapie pracy Doktorantka przeprowadziła charakterystykę funkcjonalną wybranych ligandów ludzkiego histaminowego receptora *h*H_4 opartą na bazie pochodnych 1,3,5-triazyno-2-aminy z wykorzystaniem testu akumulacji cAMP, testu rekrutacji β-arestyny przy użyciu komplementacji rozszczepionej lucyferazy oraz rekrutacji β-arestyny przy użyciu testu TANGO. Związki zostały podzielone na trzy grupy zawierające w pozycji 6 1,3,5-triazyno-2-aminy: a) podstawniki alicykliczne b) podstawiony benzen w pozycji 3 i 4 c) podstawiony tiofen. Na podstawie uzyskanych wyników wiązalności (K_i) badanej grupy ligandów receptora H_4 i wyników uzyskanych w teście akumulacji cAMP (IC_{50}) stwierdzono, że związki zawierające podstawniki fenylowe wykazują zbliżoną zależność struktura-aktywność. Sytuacja wygląda odmiennie w przypadku pochodnych zawierających podstawniki acykliczne i reszty tiofenowe, gdzie różnice w analizie SAR powinowactwa do receptora H_4 i aktywności wewnętrznej są znaczne. Zaobserwowane różnice mogą być spowodowane obecnością ww. podstawników, które mogą łączyć się ze szlakami zmniejszającymi wewnętrzną aktywność receptora hH_4 dla wszystkich szlaków transdukcji sygnału lub tylko szlaku zależnego od białka G. Dlatego oprócz wpływu na cAMP, Doktorantka podjęła próby badania wpływu badanych ww. grupy związków na inny typ wtórnego przekaźnika zaangażowanego w transdukcję sygnału z receptora H_4 - β-arestynę. W pierwszej fazie badań wszystkie związki testowano zarówno w trybie agonistycznym, jak i antagonistycznym w teście rekrutacji β-arestyny przy u życiu komplementacji rozszczepionej lucyferazy. Na podstawie uzyskanych wyników związki, które nie wykazywały zależnej od dawki zmiany sygnału oraz te, które dawały zbyt niską odpowiedź, zostały wykluczone z dalszych badań. Ligandy receptora H_4 - wybrane do określenia szczegółowego szlaku wewnętrznego β-arestyny - zostały podzielone na dwie grupy: częściowych agonistów i odwrotnych agonistów oraz antagonistów. Z przeprowadzonej analizy SAR wynika, że histamina, stosowana jako substancja odniesienia, wykazywała najwyższą aktywność agonistyczną. Pochodne fenyloetylenowe wykazywały zarówno aktywność antagonistyczną jak i aktywność odwrotnych agonistów, natomiast związki z pierścieniem tiofenowym - w zależności od charakteru i umiejscowienia podstawnika - wykazywały działanie silnie, słabo antagonistyczne lub częściowo agonistyczne. Pochodne z podstawnikiami cykloalkilowymi, fenylowymi i indolowymi wykazywały tylko działanie antagonistyczne.

Na podstawie analizy otrzymanych wyników w ww. testach Doktorantka wyciągnęła bardzo istotny wniosek wynikający z rozbieżności danych dla badanej grupy ligandów receptora H_4. Dotyczy to faktu, że rozbieżności te mogą wynikać z wpływu różnic w strukturalnej budowie ligandów na działania ukierunkowane lub prowadzące do odchyleń od określonego szlaku sygnałowego. W świetle przedstawionych badań nasuwa się wniosek, że badanie nowych potencjalnych ligandów receptora H_4 powinno uwzględniać analizę ich wpływu na szlaki transdukcji sygnału. Charakterystykę funkcjonalną ww. ligandów receptora H_4 w teście rekrutacji β-arestyny przy użyciu komplementacji rozszczepionej lucyferazy przeprowadzono w Uniwersytecie w Regensburgu. Uzyskanie powyżej przedstawionych wyników skutkowało wprowadzeniem do Zakładu Technologii i Biotechnologii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego badań opartych o rekrutację β-arestyny przy użyciu testu TANGO. W celu porównania wyników testów rekrutacji β-arestyny (komplementacja lucyferazy β-arestyny hH_4R i test hH_4R TANGO) Doktorantka wyselekcjonowała szereg ligandów pochodnych 1,3,5-triazyno-2-aminy (charakteryzujących się wysokim powinowactwem do receptor H_4; K_i<500 nM), które zawierały w pozycji 6 podstawniki: proste i rozgałęzione łańcuchy alifatyczne z pojedynczym wiązaniem podwójnym lub bez, pierścienie alicykliczne, układy aromatyczne, podstawiony tiofen z różnymi podstawnikami w różnych pozycjach pierścienia oraz związki, dla których w literaturze oznaczono zróżnicowaną aktywność w zależności od stosowanego testu. Ponadto badaniom zostały poddane związki odniesienia (histamina, R-α-metylohistamina, JNJ7777120, tioperamid). Związki te zostały przebadane w obu testach w trybie agonistycznym i antagonistycznym. W trybie agonistycznym testów rekrutacji β-arestyny porównywano maksymalną aktywność agonistyczną osiąganą przez związki i pEC_{50} badanych agonistów. Trzy związki, które nie wykazywały aktywności agonistycznej lub odwrotnej aktywności agonistycznej w teście lucyferazy β-arestyny (JN-38 – z podstawnikiem 2-tiofenowym, TR-7 – z podstawnikiem p-chlorofenylowym, KB-2 – z podstawnikiem 2-chlorotiofenowym) nie wykazały również aktywności agonistycznej lub odwrotnej aktywności agonistycznej w teście β-arestyny TANGO. Cztery związki, które wykazały aktywność agonistyczną w teście komplementacji lucyferazy, wykazały także aktywność agonistyczną w teście TANGO. (R-(α)-metylohistamina, JNJ7777120, KB-4, KB-30). JNJ77777120 i KB-30 wykazały wyższą maksymalną aktywność w teście lucyferazy, podczas gdy KB-4 wykazały wyższą maksymalną aktywność w teście Tango, R-(α)-metylohistamina wykazywała podobną aktywność w obu testach. W trybie antagonistycznym testu β-arestyny porównywano maksymalny procentowy udział aktywności antagonistycznej osiąganej przez związki i pIC_{50} antagonistów. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że: trzej antagoniści (KB-2, TR-7, JN-38) osiągnęli podobny procentowy udział maksymalnej aktywności antagonistycznej w obu testach. Dwa związki (JN-13, JN-25) wykazały wyższą aktywność antagonistyczną (>100%) w teście lucyferazy niż w teście Tango (~100%). Te dwa związki wykazywały także odwrotną aktywność agonistyczną w trybie agonistycznym w teście lucyferazy. Zarówno KB-4, jak i KB-30 wykazały słabą aktywność antagonistyczną w obu testach, podczas gdy wyższy procentowy udział aktywności antagonistycznej uzyskano w teście Tango. Na podstawie analizy zależności struktura-aktywność, w antagonistycznym trybie badań, w obu testach otrzymano podobne wyniki (tj. JN-13 > JN-25; JN-38>KB-2). Ponadto wykazano, że oba testy dały podobne wyniki w trybie agonisty. Test lucyferazy był w stanie wykryć odwrotny agonizm, podczas gdy test Tango nie. W trybie antagonistycznym pIC_{50} badanych związków wykazywały wartości na podobnym poziomie, ale z nieco wyższymi w teście Tango.

Na podstawie przeprowadzonych badań, porównując oba testy, Doktorantka stwierdziła, że stosując test Tango przetestowała dużą grupę nowych i referencyjnych ligandów hH_4R oraz wyznaczyła wewnętrzną aktywność związków agonistycznych i antagonistycznych. W

porównaniu z testem hH_4R lucyferazy, test Tango zajmuje więcej czasu (z wyjątkiem hodowli komórek i wysiewu). Jednak w teście TANGO zużywa się mniej pożywek komórkowych i odczynników niż w teście lucyferazy. Z przeprowadzonej analizy SAR Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski: najwyższe powinowactwo do receptora hH_4 wykazywał związek TR-DL-13 z ugrupowaniem cyklopenylometylenowym. Ligand ten był także najbardziej aktywnym antagonistą w teście TANGO. Interesujące różnice pomiędzy powinowactwem do receptora hH_4 a aktywnością wewnętrzną zaobserwowano w grupie pochodnych aromatycznych. Obecność chloru w pierścieniu zapewniła lepsze powinowactwo do receptora hH_4 niż obecność podstawnika metylowego w tej samej pozycji. Odwrotna sytuacja miała miejsce w badaniach w teście TANGO; podstawnik metylowy zapewniał lepszą aktywność wewnętrzną niż chlor. Inne interesujące obserwacje odnotowano dla grupy pochodnych tiofenu. Powinowactwo do receptora hH_4 i aktywność β-arestyny pochodnych 2-tiofenylu były bardzo zbliżone. Obecność ugrupowania 3-halogeno-(2-tiofenylowego) zapewniało aktywność w trybie agonisty, podczas gdy 4 i/lub 5 podstawione ugrupowanie 2-tiofenylu zapewniało aktywność w trybie antagonisty w teście β-arestyny. Ponadto ugrupowanie 3-tiofenylowe zapewniało wyższe powinowactwo i aktywność wewnętrzną niż ugrupowanie 2-tiofenylowe. W świetle przedstawionych wyników, uzasadnionym wydaje się być synteza większej liczby związków z ugrupowaniem 3-tiofenylowym zawierającym halogenki lub podstawnik metylowy w różnych pozycjach. Mogą one potencjalnie wykazywać lepsze powinowactwo i interesujący profil aktywności wewnętrznej.

W podsekcji 3.2 zatytułowanej „Wielokierunkowa aktywność ligandów ludzkich receptorów histaminowych H_3 i adenozynowych", która stanowi zasadniczą część rozprawy doktorskiej i oparta jest na wynikach opisanych w trzech artykułach eksperymentalnych. Artykuły te opublikowano w czasopismach międzynarodowych (suma IF = 11,931). W jednym z trzech artykułów Doktorantka jest pierwszą autorką a w dwóch pozostałych drugą. Do obszernie i szczegółowo omawianych wyników, zostały dołączone kopie oryginalnych artykułów wraz z materiałami informacyjnymi. Wartym podkreślenia jest fakt, że oprócz ww. artykułów mgr Olejarz-Maciej jest współautorką jedenastu artykułów ściśle powiązanych z tematyką przedstawioną w rozprawie doktorskiej. Do badań ligandów receptora H_3, które mogły wykazywać dodatkowe działanie hamujące wobec enzymu MAO-B Doktorantka wybrała serie analogów dwóch związków wiodących DL-76 (pochodnych tert-butylobenzenu) i DL-77 (pochodnych tert-amylobenzenu). W badanych seriach pochodnych wydłużany był łańcuch alkiloksylowy a pierścień pirydynowy został zastąpiony takimi układami heterocyklicznymi jak: pirolidyna, pochodnymi metylopiperydyny i dimetylopiperydyna oraz azepanem. Dla serii pochodnych DL-76, na podstawie analizy zależności struktura-aktywność Doktorantka wykazała, że największą siłę hamowanie MAO-B wykazywały związki zawierające łącznik z trzema atomami węgla. Wraz z jego wydłużeniem siła hamowania MAO-B malała. Najbardziej korzystnymi układami heterocyklicznymi w hamowaniu MAO-B (dla związków z najkrótszym, 3-węglowym łącznikiem) były: pirolidyna (E-286: IC_{50} = 2,7 nM), 2-metylopiperydyna (E-270: IC_{50} = 10,8 nM), azepan (E-265: IC_{50} = 45,3 nM). Analogiczna analiza dla serii DL-77 wykazała, że związki z 3 atomami węgla zawierające pirolidynę (E-289, IC_{50} = 4,5 nM), 2-metylopiperydynę (E-293, IC_{50} = 20 nM), 2 ,6-dimetylopiperydynę (E-292, IC_{50} = 22 nM) oraz azepan (E-296, IC_{50} = 65 nM), wykazywały najwyższą siłę hamowania MAO-B. Słabsze hamowanie MAO-B występowało przy wprowadzeniu 3,3-dimetylopiperydyny (E-290, IC_{50} = 417 nM), 3-metylopiperydyny (E-294, IC_{50} = 428 nM) i 3,5-dimetylopiperydyny (E-291 , IC_{50} = 962 nM). W celu sprawdzenia selektywności siły hamowania MAO-B, najbardziej aktywne inhibitory MAO-B z analogów DL-76 i DL-77 zbadano pod kątem możliwego hamowania MAO-A. Z serii analogów DL-76 wybrano wszystkie związki, które wykazywały hamowanie MAO-B, z serii analogów DL-77 jedynie związki o IC50 < 380 nM.

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Olejarz-Maciej wykazała, że zarówno analogi DL-76 i DL-77 selektywnie hamują MAO-B. Związki z łącznikiem węglowym zawierającym 3 atomy węgla wykazywały najsilniejsze hamowanie MAO-B. Dłuższy łańcuch węglowy powodował słabszą aktywność hamowania MAO-B. Zastąpienie piperydyny pirolidyną, 2-metylopiperydyną, 2,6-dimetylopiperydyną, azepanem i 3-metylopiperydyna prowadziło do otrzymania związków o większej sile hamowania. Porównanie pochodnych *tert*-amylobenzenu i *tert*-butylobenzenu wykazało podobne właściwości hamowania MAO-B. W niektórych przypadkach pochodne *tert*-amylobeznu zapewniał silniejsze hamowanie MAO-B (np. pochodne piperydyny i pochodne 3,3-dimetylopiperydyny z 3 atomami węgla w łączniku). Na podstawie analizy zależności struktura aktywność obu serii analogów związków wiodących DL-76 i DL-77 Doktorantka wskazała elementy struktury, które były korzystne dla ligandów docelowych wykazujących dwukierunkowe działanie wobec MAO-B i receptora hH$_3$ tj. krótki łącznik węglowy (zawierający trzy grupy metylenowe) oraz pierścień heterocykliczny taki jak: pirolidyna, piperydyna, 2-metylopiperydyna, 3-metylopiperydyna, 2,5-dimetylopiperydyna, lub azepan.
W kolejnym etapie badań mgr Agnieszka Olejarz-Maciej wybrała kilka związków (opublikowanych lub niepublikowanych) z biblioteki Zakładu Technologii i Biotechnologii Leków w celu określenia ich dwukierunkowego działania wobec MAO-B i receptorów adenozynowych. Związki te zostały podzielone na następujące podgrupy pochodne: a) trójcyklicznej ksantyny (zawierający podstawnik benzylowy, dihydroksybenzyloaminowy lub dopaminę oraz analogi bez trzeciego pierścienia) b) teofiliny (zawierające dopaminę w pozycji 8 i podstawnik alifatyczny lub aryloalifatyczny w pozycji 7), c) teobrominy (zawierające dopaminę w pozycji 8 i podstawnik alifatyczny lub aryloalifatyczny w pozycji 1), d) teofiliny i teobrominy z zablokowanymi grupami hydroksylowymi. Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka wyciągnęła następujące wnioski: a) w grupie pochodnych trójcyklicznych ksantyn: Do najaktywniejszych z grupy tricyklicznych pochodnych ksantyny zaliczały się związki, które posiadały jeden (MZ-1423) lub dwa (JS16006, JS16015, MZ-1504) podstawniki halogenowe w grupie benzylowej. Aktywność hamowania MAO-B wahała się od IC_{50} = 82,6 nM (JS16015) do IC_{50} = 243 nM (MZ-1504).
Związki wykazywały selektywność wobec izoformy MAO-B (MAO-A IC_{50} > 1000 nM). Analogiczne związki bez trzeciego pierścienia nie wykazywały hamowania MAO-B (MZ-1476, MZ-1488, MAO-B IC50 > 1000 nM). Brak trzeciego pierścienia wiązał się z większym powinowactwem do receptora adenozynowego A_{2A} (MZ-1476: $_{Ki}$ = 283 nM, MZ-1488: K_i = 148 nM). Zmiana z monohalogenowej lub dihalogenowo podstawionej reszty benzylowej na podstawnik dihydroksybenzylowy (MZ-1470) spowodowała niższą aktywność hamowania MAO-B (IC_{50} > 1000 nM), a także brak powinowactwa do receptorów adenozynowych Zamiana podstawnika dihydroksybenzyloaminwego na dopaminę (KD-393 i KD-452) wykazała pewną aktywność hamowania MAO-B (KD-452: IC_{50} = 97,2 nM, KD-393: IC = 155 nM), ale związki nie osiągnęły maksymalnej aktywności hamującej. W grupie b) pochodnych teofiliny. Wszystkie pochodne wykazywały częściowe działanie hamujące wobec MAO-B. Wśród alifatycznych pochodnych teofiliny związki z podstawnikiem metylowym, etylowym, butylowym, pentylowym i heksylowym w pozycji 7 wykazywały podobną aktywność wobec MAO-B (IC_{50} =41,5 – 76,4 nM; 49-62% maksymalnej aktywności hamowania). Najsłabszą aktywność wykazał związek z podstawnikiem propylowym w (KD-403: IC_{50} = 152 nM, 51%). Wydłużenie łańcucha alifatycznego spowodowało spadek powinowactwa do receptora A_{2A} (od KD-444 K_i = 370 nM (dla łącznika zawierającego jeden atom węgla) do KD-445 K_i > 10000 (dla łącznika zawierającego 6 atomów węgla). Sytuacja wyglądała odmiennie w przypadku receptora A_{1A}, powinowactwo wzrosło w od K_i = 1980 nM dla pochodnej KD-444 do K_i = 304 nM i K_i = 191 nM dla związków zawierających łączniki z 4 i 5 atomami węgla (KD-437 i KD-459). W grupie c) pochodnych teobrominy

wydłużenie łańcucha węglowego spowodowało wzrost maksymalnego hamowania (od podstawnika metylowego do heksylowego: DS-14: 71%, DS-13: 87%, DS-16:91%, DS-22: 97%), dalsze wydłużanie łańcucha do heptylu i oktylu nie wywoływał zmian w sile hamowanie badanych związków (DS-18: 100%, DS-20: 97%). Wszystkie aryloalkilowe pochodne teobrominy osiągnęły ponad 93% maksymalnego hamowania MAO-B. Wśród związków z niepodstawionym pierścieniem aromatycznym wydłużenie łącznika alifatycznego z jednego atomu węgla (DS-6: IC_{50} = 121 nM) do trzech (DS-26: IC_{50} = 91,8 nM) tylko nieznacznie zwiększyło aktywność wobec MAO-B. Wprowadzenie do pierścienia benzenowego jednego chloru (DS-7: IC_{50} = 111 nM) lub jednego bromu (DS-24: IC_{50} = 112 nM) nie zmieniło siły hamowania wobec MAO-B w porównaniu z pierścieniem niepodstawionym. Natomiast obecność fluoru w związku (DS-28: IC_{50} = 37,3 nM) zwiększyło siłę hamowania wobec MAO-B. Wprowadzenie dwóch atomów chloru w pozycje 2,4 prowadziło do nieco wyższej siły hamowania (Tb-1: IC_{50} = 2,61 nM) niż ich obecność w pozycjach 3,4 (IC_{50} = 13,4 nM). W grupie pochodnych d) teofiliny i teobrominy z zablokowanymi grupami hydroksylowymi. Blokada grup hydroksylowych w teofilinie i pochodnych teobrominy spowodowała spadek aktywności hamowania MAO, ale nie zmniejszyła powinowactwa do receptorów A_{2A} dla większości związków. Związki wykazujące interesujące właściwości hamowania MAO-B testowano względem MAO-A w celu sprawdzenia selektywności inhibitorów (w jednym, dwóch lub trzech stężeniach). Grupa alkiloaromatycznych pochodnych teobrominy, które były najbardziej aktywne w teście MAO-B, wykazywała pewną aktywność MAO-A i dlatego została wybrana do eksperymentów zależnych od dawki. Do testów MAO-A wybrano także kilka pochodnych teofiliny. I tak, wprowadzenie teofiliny i pochodne teobrominy z ugrupowaniem dopaminowym były w stanie hamować izoenzym MAO-A. Ponadto wykazano, że żaden z badanych związków nie wykazał pełnego hamowania MAO-A. Najwyższy procent maksymalnego hamowania osiągnęły związki DS-7, DS-24 (80%). Wszystkie pochodne teofiliny testowane w sposób zależny od dawki dla obu izoenzymów wykazywały niższe IC_{50} dla MAO-B, ale osiągały wyższy procent maksymalnego hamowania MAO-A. Natomiast w przypadku pochodnych teobrominy testowane związki, w sposób zależny od dawki dla obu izoenzymów, wykazywały lepsze IC_{50} i osiągały wyższy procent maksymalnego hamowania MAO-B.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka przeprowadziła badania odwracalności hamowania i modalności hamowania MAO-B dla ligandów ludzkiego receptora histaminowego H_3 i dla ligandów receptorów adenozynowych A_1 i A_{2A}. Do badania odwracalności hamowania MAO-B Doktorantka wybrała najbardziej aktywne inhibitory MAO-B z grupy analogów DL-76 i DL-77 o dwukierunkowym działaniu (*h*H_3, MAO-B). Do badań odwracalność hamowania MAO-B przez ligandy receptorów adenozynowych zostały wyselekcjonowane trójcykliczne pochodne ksantyny: MZ-1423, JS16015, JS16006, MZ-1504 oraz pochodne teobrominy: DS-9, Tb-1, DS-6. Wszystkie wybrane związki zostały przebadane wraz z dwoma inhibitorami referencyjnymi: odwracalnym safinamidem i nieodwracalną rasagiliną. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że wszystkie badane pochodne wykazują odwracalne hamowanie MAO-B.. Po potwierdzeniu odwracalności badanych związków do testów kinetycznych wybrano 3 związki i safinamid z grupy pochodnych (*h*H_3, MAO-B) i 2 związki z grupy ligandów receptorów adenozynowych (MZ-1504, Tb-1). Dla wszystkich badanych związków potwierdzono mieszany sposób hamowania, z większym powinowactwem do wolnego enzymu niż do kompleksu enzym-substrat. Podobną modalność, w tych samych warunkach testu, zaobserwowano dla referencyjnego odwracalnego inhibitora – safinamidu.

Część 4 przedstawionej do recenzji rozprawy zawiera krótkie podsumowanie wszystkich przeprowadzonych badań. W części 5 zatytułowanej „Materiały i metody" przedstawiony został opis stosowanych metod oraz materiały, które były niezbędne do przeprowadzenia zaplanowanych badań.

Niewątpliwym osiągnięciem przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej są przeprowadzone badania aktywności wewnętrznej serii ligandów histaminowych receptorów ludzkich H_3 i H_4 wykorzystujące szlaki możliwych przekaźników wtórnych. Koncepcja wewnętrznej skuteczności jest zakorzeniona w farmakologii od ponad siedemdziesięciu lat, jednak najnowsze dane ujawniły, że wiele ligandów może w różny sposób aktywować szlaki sygnalizacyjne, w których pośredniczy pojedynczy receptor sprzężony z białkiem G, w sposób podważający tradycyjną definicję skuteczności wewnętrznej. Niektóre terminy określające to zjawisko obejmują selektywność funkcjonalną. W skrajnym przypadku funkcjonalnie selektywne ligandy mogą być zarówno agonistami, jak i antagonistami w różnych funkcjach, w których pośredniczy ten sam receptor. Oprócz interesującego heurystycznie charakteru selektywności funkcjonalnej, istnieje wyraźny wpływ na odkrywanie leków, ponieważ mechanizm ten zwiększa możliwość selekcji lub projektowania nowych ligandów, które w różny sposób aktywują tylko określoną podjednostkę pojedynczego receptora, optymalizując w ten sposób działanie terapeutyczne.
Poszukiwanie leków o wielokierunkowym działaniu, tak jak to ma miejsce w recenzowanie rozprawie doktorskiej, ma ogromne znaczenie w wieloczynnikowych chorobach OUN takich jak: depresja, schizofrenia, choroba Parkinsona (PD) i choroba Alzheimera (AD). Jeżeli uda się zaprojektować pojedynczą cząsteczkę leku, która będzie zdolna do jednoczesnego oddziaływania z wieloma celami to choroby neurodegeneracyjne będzie można leczyć z wyższą skutecznością, niższą toksycznością, mniejszą liczbą interakcji lek-lek. Niewątpliwie, przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki dotyczące aktywności związków in vitro dają istotny wgląd w zależność struktura-aktywność co powinno przyczynić się do projektowania nowych funkcjonalnie selektywnych wielocelowych ligandów.

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.

Jednak, obok tej wysokiej oceny merytorycznej przedstawionych osiągnięć, mam też kilka uwag krytycznych. Drobne nieścisłości, przeoczenia i błędy drukarskie nie wpływają w istotny sposób na ogólną ocenę pracy. Natomiast tytuł rozprawy „Wielokierunkowe działanie nowych ligandów receptorów histaminowych i adenozynowych" jest mylący. Przedstawione badania dotyczą tylko ligandów receptorów histaminowych H_3 i H_4. Analogiczna sytuacja dotyczy receptorów adenozynowych badane były tylko ligandy receptorów A_1 i A_{2A} a nie wszystkich znanych – jaki był powód takiego uogólnienia tematu rozprawy doktorskiej?

Moim zdaniem recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania postawione tezom mającym na celu uzyskanie stopnia doktora określone 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.) i pokazuje zdolność Doktorantki do krytycznego myślenia i pracy naukowej w zespole w dziedzinach biochemii i farmakologii. Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, o dopuszczenie mgr Agnieszki Olejarz-Maciej do dalszych etapów postepowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Biorąc pod uwagę ogromny nakład pracy Doktorantki oraz uzyskane wyniki badań, które mogą przyczynić się do projektowania nowych funkcjonalnie selektywnych ligandów o wielokierunkowym działaniu wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej (uzasadnienie w załączeniu)

Signed by /
Podpisano przez:

Krzysztof Włodzimierz Walczyński
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Date / Data:
2023-09-12 17:30