

Dr hab. Krzysztof Kamiński, Prof. UJ
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii Farmaceutycznej, Zakład Chemii Leków
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
e-mail: k.kaminski@uj.edu.pl
Tel. 12 620 54 59



Ocena

rozprawy doktorskiej pt. „*Synteza i aktywność biologiczna nowych pochodnych pirolo[3,4-d]pirydazyonu*” wykonanej przez mgr Łukasza Szczukowskiego w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. Piotra Świątka, prof. uczelni.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o cykl trzech prac oryginalnych opublikowanych w latach 2020–2021 w renomowanych czasopismach specjalistycznych, tj. *Bioorganic Chemistry* (2020) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (2020, 2021). Łączny współczynnik IF wspomnianych publikacji jest wysoki i wynosi 17,516, a liczba punktów MNiE to 380. **W każdej z wymienionych publikacji Doktorant jest autorem pierwszym i korespondencyjnym, co potwierdza jego dominującą rolę w prowadzonych badaniach (w szczególności chemicznych), a także w opracowaniu poszczególnych manuskryptów.** Stwierdzenie to znajduje również odzwierciedlenie w oświadczeniach pozostałych współautorów, które zostały dołączone do rozprawy doktorskiej, i które w sposób precyzyjny wskazują na wkład poszczególnych osób zaangażowanych w badania naukowe będące przedmiotem dysertacji. **Należy z całym naciskiem podkreślić, iż poruszona przez Doktoranta tematyka badawcza, związana z rozwojem kandydatów na nowe leki przeciwbólowe i przeciwzapalne jest niezwykle istotna i aktualna biorąc pod uwagę niejednokrotnie niską skuteczność kliniczną, a także szereg działań niepożądanych preparatów dedykowanych do leczenia bólu oraz chorób o podłożu zapalnym. W tym aspekcie, szczególnie cenne wydaje się poszukiwanie nowych kandydatów do terapii bólu neuropatycznego, którego farmakoterapia jest nieskuteczna u ponad 50% chorych, a w jego łagodzeniu szczególnie ciekawe mogą okazać się związki o ośrodkowych mechanizmach działania.**

Rozprawa doktorska ma formę rozbudowanego autoreferatu, na który składają się wprowadzenie, cel pracy, opis zastosowanych metod badawczych, prezentacja i omówienie wyników badań, podsumowanie oraz wnioski. Część z wyżej wymienionych rozdziałów została słusznie zredukowana i odnosi się bezpośrednio do publikacji. Rozprawę uzupełnia wykaz zastosowanych skrótów, streszczenie oraz trafnie dobrana i aktualna bibliografia obejmująca 61 pozycji. Wszystkie wspomniane części zostały w całości przetłumaczone na język angielski, co niewątpliwie wymagało znacznego nakładu pracy przez Doktoranta, natomiast w mojej ocenie nie było to konieczne mając na uwadze fakt, iż integralną część dysertacji stanowią publikacje przygotowane w języku angielskim. W pracy znajdują się również stosowne oświadczenia współautorów ww. prac oryginalnych.

Informacje zamieszczone we wstępie rozprawy w zwięzły, ale satysfakcjonujący sposób charakteryzują m.in. proces zapalny, funkcję poszczególnych izoform 1–3 cyklooksygenazy (COX), a także działania niepożądane znanych NLPZ, co według mojej opinii uzasadnia celowość prowadzonych badań naukowych. W tej części rozprawy dyskusyjne wydaje się natomiast stwierdzenie Doktoranta, iż modyfikacje strukturalne znanych NLPZ mogą przyczynić się do obniżenia ich toksyczności, bowiem w ogromnej większości przypadków obserwowane działania niepożądane wynikają bezpośrednio z mechanizmu działania, co zostało podkreślone także w rozprawie. W tym kontekście, w mojej ocenie, korzystnie byłoby również opisać najnowsze cele molekularne dla kandydatów na nowe i potencjalnie skuteczniejsze leki przeciwzapalne lub/i przeciwbólowe, takie jak m.in. kanał TRPV1, kanały wapniowe typy L i T, kanały sodowe Nav1.7/Nav1.8, receptory kannabinoidowe CB1/CB2, receptory NMDA, serotoninowe, sigma i wiele innych, mimo, że mechanizmy te nie korespondują bezpośrednio z zakresem badań farmakologicznych proponowanych dla nowo otrzymanych pochodnych. Niemniej jednak, według mojej opinii, budowa chemiczna opisanych związków może sugerować zdecydowanie multimodalny mechanizm działania, w tym między innymi wpływ na kanał TRPV1, będący aktualnie jednym z najbardziej atrakcyjnych i szeroko eksplorowanych „targetów” biologicznych dla substancji o aktywności antynocyceptywnej. Warto podkreślić w tym miejscu, iż problematyka poruszona przez Doktoranta nawiązuje do wieloletnich prac chemiczno-farmakologicznych w grupie pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazyno-1,4-dionu, prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (patrz badania Prof. Wiesława Malinki). **Wybór układu podstawowego, tj. pirydazynonu uzasadnia również przegląd literatury dokonany przez Doktoranta, który wskazuje na silne działanie przeciwzapalne lub/i przeciwbólowe związków posiadających w strukturze wspomniany układ farmakoforowy, w tym m.in. emorfazonu, leku zarejestrowanego w Japonii we wskazaniach bólowych.**

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było opracowanie nowej klasy silnych inhibitorów cyklooksygenazy (COX), preferencyjnie izoformy indukowanej (COX-2), charakteryzujących się niską gastrotoksycznością, będących pod względem strukturalnym połączeniami hybrydowymi, pochodnymi pirolo[3,4-*d*]pirydazyno-1,4-dionu modyfikowanymi fragmentami 1,3,4-oksadiazolu i 1,2,4-triazolu. Hipoteza badawcza zakładająca otrzymanie serii oryginalnych związków, będących analogami opisanych wcześniej pochodnych pirolo[3,4-*d*]pirydazyno-1,4-dionu reprezentowanych przez związki modelowe o symbolach 8a i 8b, ale cechujących się w stosunku do nich silniejszą inhibicją COX-2 lub/i obniżoną toksycznością (m.in. w odniesieniu do wpływu na przewod pokarmowy), pojawia się we Wstępie rozprawy, co jest w mojej opinii nieco mało czytelne. Wg mnie korzystniej byłoby wydzielić ten fragment, łącznie z uzasadnieniem proponowanych modyfikacji chemicznych jako osobny podrozdział zatytułowany „Założenia badań” lub „Hipoteza badawcza”. **Uwagę tą należy traktować jedynie jako sugestię ułatwiającą podążanie za tokiem myślowym Autora, natomiast proponowane przez Doktoranta modyfikacje struktury rdzeniowej, m.in. wprowadzenie heterocyklicznych bioizosterów grupy karboksylowej (tj. 1,3,4-oksadiazolu i 1,2,4-triazolu) w celu obniżenia kwasowości nowo otrzymanych połączeń lub inkorporowanie farmakoforowego fragmentu arylopiperydyny lub arylopiperydyny celem wzmocnienia aktywności biologicznej są dobrze uzasadnione w oparciu o dane literaturowe.** W mojej ocenie pojawiające się w tej części pracy

koksyby, będące selektywnymi inhibitorami COX-2, zostały przywołane błędnie, ponieważ żaden z otrzymanych przez Doktoranta związków nie posiada w swojej strukturze pierścieni heterocyklicznych występujących w budowie chemicznej wspomnianych NLPZ (m.in. tetrahydrofuranu – rofekoksyb lub pirazolu – celekoksyb).

Metodyka badań chemicznych, które to stanowią *nota bene* podstawę ubiegania się kandydata o stopień doktora, została opisana w sposób przejrzysty, szczegółowy i wyczerpujący, a zastosowane techniki służące do kontrolowania postępu reakcji, oczyszczania otrzymanych substancji, a także do celów analitycznych, tj. ocena czystości i potwierdzenie struktury, są adekwatne i powszechnie uznawane za wystarczające. W mojej ocenie wśród zastosowanych metod brakuje oceny czystości przy zastosowaniu techniki HPLC, która jest bezdyskusyjnie najlepszym narzędziem służącym do tego celu.

W ramach prowadzonych prac badawczych Doktorant w wyniku kilkietapowego postępowania syntetycznego otrzymał łącznie 36 oryginalnych połączeń, z czego 18 to pochodne 1,3,4-oksadiazolowe i ta sama liczba analogów 1,2,4-triazolowych. Związki te zostały uzyskane stosując reakcje alkilowania (w tym aminometylowania w przypadku *N*-zasad Mannich'a), cyklizacji oraz tworzenia amidów. Dlatego też, w obu ww. seriach można wyróżnić substancje będące pod względem strukturalnym *N*-zasadami Mannich'a lub amidami, w których funkcję aminową tworzą różnie podstawione pochodne arylopiperyliny lub arylopiperydyny. W moim odczuciu fragmenty rozprawy dotyczące badań chemicznych, których głównym wykonawcą był Doktorant, zostały potraktowane nieco zbyt skrótowo w stosunku do opisu badań *in silico*, a także badań farmakologicznych *in vitro* i *in vivo*, za które odpowiadali pozostali współwykonawcy, i które służyły jedynie do zweryfikowania postawionej hipotezy badawczej. **Należy jednak podkreślić, iż zakres prac chemiczno-analitycznych opisanych w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład cyklu jest znaczący, a każdy z produktów pośrednich został niezwykle wyczerpująco scharakteryzowany na podstawie danych spektralnych, co zwykle nie jest wymagane w wielu czasopismach specjalistycznych. Wskazuje to niewątpliwie na pracowitość i dobrą znajomość metod analitycznych przez Doktoranta.**

Oceniana rozprawa posiada charakter multidyscyplinarny i obejmuje syntezę organiczną, a także panel testów *in vitro* oceniających interakcję otrzymanych pochodnych z COX-1 i COX-2, wiązanie się substancji z albuminami osocza, ocenę cytotoksyczności na linii komórkowej fibroblastów ludzkich (jako element badań ADME-Tox), a także potwierdzenie aktywności przeciwzapalnej i przeciwbólowej oraz wpływu na błonę śluzową przewodu pokarmowego dla wybranych związków w modelach zwierzęcych. Na uwagę zasługuje fakt, iż badania *in vivo* poprzedzone zostały wstępną oceną toksyczności w warunkach *in vitro*, co jest zgodne z aktualnymi wytycznymi w procesie rozwoju nowych substancji leczniczych. **W mojej ocenie zakres badań został skonstruowany prawidłowo i kompleksowo, co pozwoliło na zweryfikowanie postawionej hipotezy badawczej, zrealizowanie celu badań, a także wyselekcjonowanie kandydatów na nowe leki przeciwbólowe/przeciwzapalne do szerszego rozwoju przedklinicznego.**

Najważniejszym osiągnięciem Doktoranta wynikającym z przeprowadzonych badań było zidentyfikowanie związków będących stosunkowo silnymi inhibitorami COX-1 i COX-2, a także substancji hamujących preferencyjnie lub selektywnie izoformę indukowaną COX-2 (w szcze-

gólności były to *N*-zasady Mannich'a), co stanowiło zasadniczy cel mechanistyczny prowadzonych badań. Na uwagę zasługuje również fakt, iż większość z otrzymanych pochodnych działała efektywniej na COX-2, aniżeli meloksykam będący ważnym klinicznie NLPZ, o preferencyjnej inhibicji COX-2, który został użyty jako substancja referencyjna. Warto podkreślić, iż sposób oddziaływania nowo otrzymanych związków z COX-1 i COX-2 przeanalizowano z sukcesem w badaniach modelownia molekularnego. Uzpełnieniem charakterystyki farmakologicznej była ocena aktywności antyoksydacyjnej oraz interakcji z albuminami osocza w badaniach *in vitro*, a dla wyselekcjonowanych i najbardziej obiecujących pochodnych wykonano testy *in vivo* na myszach pod kątem działania antynocyceptywnego w teście odsunięcia ogona i modelu bólu tonicznego indukowanego formaliną oraz działania przeciwzapalnego w teście karageninowym. Dodatkowo dla związków tych zbadano ich wpływ na stężenie prostaglandyny E2 (PGE2) i mieloperoksydazy oraz gastrotoksyczności (profil bezpieczeństwa). **W rezultacie, przeprowadzone badania chemiczno-farmakologiczne umożliwiły wyselekcjonowanie związków o aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej zbliżonej do indometacyny, co niezwykle istotne pozbawionych działania gastrotoksycznego, charakterystycznego dla ww. referencyjnego preparatu, a także posiadających korzystne właściwości antyoksydacyjne. W mojej ocenie, związki o opisanym powyżej profilu farmakologicznym mogą być ciekawymi kandydatami do bardziej szczegółowego rozwoju przedklinicznego, bądź dalszych optymalizacji strukturalnych, które umożliwią poprawę właściwości fizykochemicznych cząsteczek, a w szczególności penetrowanie do OUN, które to może okazać się niewystarczające w celu uzyskania efektów ośrodkowych (patrz dane fizykochemiczne *in silico*, publikacja P3).**

Podsumowując, uzyskane wyniki uważam z całym przekonaniem za oryginalne i wartościowe dla rozwoju dyscypliny nauki farmaceutycznej, w szczególności specjalności chemia leków, a formę ich dyskusowania za satysfakcjonującą i na tym etapie wyczerpującą. Badania ujęte w rozprawie doktorskiej zostały zaplanowane w sposób logiczny i konsekwentnie zrealizowane. Doktorant w sposób jasny formułuje zakładane cele, umiejętnie dobiera odpowiednie narzędzia badawcze służące weryfikacji hipotezy badawczej, planuje kolejne eksperymenty w kooperacji z przedstawicielami innych jednostek, co uważam za bardzo cenne dla prac doświadczalnych, i co świadczy o dojrzałości naukowej, a także umiejętności pracy zespołowej kandydata do stopnia doktora.

Szczegółowa analiza wyników opisanych w rozprawie rodzi pewne wątpliwości, pytania i sugestie, które w przyszłości mogą pozwolić na lepsze planowanie badań, w rezultacie opracowanie kolejnych wartościowych publikacji, a być może przygotowanie związku/projektu do komercjalizacji:

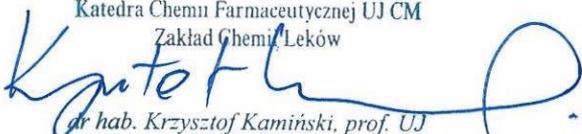
- Czy Doktorant projektując związki o budowie hybrydowej oczekiwał uzyskać pochodne o selektywnym wpływie na COX-2, czy też substancje o wielocelowej farmakodynamice?
- Czy próbowano modyfikować warunki reakcji tak by można było uzyskać wyłącznie pochodne podstawione na atomie tlenu lub atomie azotu (patrz związki wyjściowe **9** i **10** na Ryc. 5, strona 23). Czy *N*-podstawione pochodne mogą również okazać się ciekawe z punktu widzenia działania biologicznego?

- Czy zbadana została stabilność chemiczna i metaboliczna związków o charakterze *N*-zasad Mannich'a? Tego typu połączenia tworzy się zwykle jako proleki ze względu na niską stabilność metaboliczną. Czy fakt ten może mieć implikacje kliniczne?
- Czy przeprowadzono albo planuje się badania farmakokinetyczne dla najaktywniejszych pochodnych? Jest to kluczowe dla rzetelnej analizy PK/PD, a w szczególności możliwości osiągnięcia stężenia efektywnego w osoczu i potencjalnie OUN? Wydaje się to być kluczowe mając na uwadze silne wiązanie się otrzymanych związków z albuminą bydłęcą, a tylko frakcja wolna związku decyduje o działaniu biologicznym,
- Czy istnieje racjonalne uzasadnienie obecności ugrupowania sulfinyłowego i tioeteru w otrzymanych związkach, zamiast grupy karbonylowej i eteru, które występują znacznie częściej w strukturach znanych leków?
- Masy wszystkich jonów pseudomolekularnych w publikacjach **P1–P3** podano z dokładnością do 0,0001. Czy widma masowe wykonano techniką HRMS?
- Czy w przypadku badań *in vivo* oceniono również wpływ związków na ruchliwość spontaniczną myszy? Jest to istotne, ponieważ działanie sedatywne substancji może powodować fałszywie dodatnie wyniki w obu zastosowanych modelach bólu,
- W mojej ocenie związek **7b** opisany w publikacji **P1**, który został przywołany na stronie 44 rozprawy, nie jest najsilniejszym inhibitorem COX-1 lub/i COX-2,
- Dość niefortunne wydaje się zredagowanie tytułu kilku akapitów jako „Projekt i synteza”, wg mojej opinii o wiele lepsze wydaje się wyrażenie „Projektowanie i synteza”,
- Termin „racjonalne projektowanie” pojawiający się w rozdziale „Cele pracy” wydaje się być skrótowo myślowym, ponieważ metoda ta zakłada wykorzystanie trójwymiarowej struktury celu molekularnego,
- Zastanawiająca jest dość znacząca różnica w inhibicji COX-1 przez meloksykam w publikacji **P1** i **P2**, mianowicie odpowiednio $IC_{50}=104,5 \mu M$ oraz $IC_{50}=83,7 \mu M$. Jak można wytłumaczyć tę rozbieżność?

Reasumując, pod względem merytorycznym i formalnym przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574, z późn. zm.), zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, o jej przyjęcie i dopuszczenie Autora, mgr Łukasz Szczukowski, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, mając na uwadze innowacyjność, multidyscyplinary charakter, kompleksowość i wysoki poziom naukowy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej, a także fakt, że opisane w niej badania są przedmiotem trzech prac oryginalnych w czasopiśmie o uznanej w środowisku renomie, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Kraków, 27.06.2022

Katedra Chemii Farmaceutycznej UJ CM
Zakład Chemii Leków

dr hab. Krzysztof Kamiński, prof. UJ