

Prof. dr hab. Andrzej Gzella
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań



e-mail: akgzella@ump.edu.pl
tel.: +4861 854 66 79; fax: +4861 854 66 80

Poznań, dnia 6 sierpnia 2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Skubiszewskiej pt.

***”Badania wybranych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym w zaburzeniach funkcjonowania układu nerwowego”* wykonanej pod kierunkiem dr hab. Alicji Nowaczyk, prof. UMK i dr. Łukasza Fijałkowskiego /promotor pomocniczy/ na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Przekazana mi do oceny rozprawa doktorska mgr Skubiszewskiej dotyczy bardzo dynamicznie rozwijającego się w ostatnich latach kierunku badań określanego mianem farmakologii bezpieczeństwa (safety pharmacology). Dostarczenie danych o działaniach niepożądanych leków, w tym szczególnie określenie mechanizmów działań niepożądanych, jest szalenie istotne w planowaniu i opracowywaniu nowych strategii badawczych. W Stanach Zjednoczonych zasady bezpieczeństwa stosowania leków są określone oraz weryfikowane przez Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drugs Administration, FDA), zaś w Europie nadzorem i monitorowaniem bezpieczeństwa farmakoterapii zajmuje się Europejska Agencja Leków (EMA). Polskim odpowiednikiem tej ostatniej jest Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych (URPL). Wymienione instytucje wydają pozwolenia dopuszczające do obrotu środki lecznicze oraz weryfikują spełnienie zasad bezpieczeństwa leków już zatwierdzonych i dopuszczonych do lecznictwa.

Przedmiotem badań mgr Skubiszewskiej prowadzonych w ramach pracy doktorskiej były dwa znane leki tiagabina (TGB) i paroksetyna (PRX) używane w terapii zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego. Wybór padł na wymienione leki – jak rozumiem - z uwagi na nie do końca zdefiniowany mechanizm modulacji układu nerwowego przez te substancje. Ponadto w odniesieniu do tiagabiny z danych literaturowych wynika, że u około 1% pacjentów, którym lek podawano, pojawiało się działanie uboczne w postaci tachykardii (częstoskurczu serca).

Tematyka pracy Doktorantki wpisuje się w nurt badań naukowych prowadzonych przez promotora pracy dr hab. Alicję Nowaczyk, prof. UMK z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu.

W badaniach dotyczących tiagabiny mgr Skubiszewska dokonała oceny możliwości wywołania tachykardii przez lek wskutek interakcji tiagabiny z kanałami jonowymi $K_v11.1$, $Na_v1.5$, $Ca_v1.2$, mającymi decydujący wpływ na ryzyko pojawienia się arytmii.

W przypadku paroksetyny Doktorantka przeanalizowała wpływ leku na poziom neuroprzekazników kluczowych w występowaniu depresji, to jest serotoniny (SER), noradrenaliny (NE), dopaminy (DA) oraz dodatkowo kwasu γ -aminomasłowego (GABA), a to z uwagi na nie do końca wyjaśniony mechanizm działania neurogennej paroksetyny w centralnym układzie nerwowym.

Badania obydwu wymienionych wyżej leków Doktorantka przeprowadziła metodami *in silico*, zaś walidację uzyskanych wyników testami *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo* na szczurach. Praca została wykonana we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, to jest z Katedrą Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie i Katedrą Projektowania Leków i Farmakologii Wydziału Zdrowia i Nauk Medycznych Uniwersytetu Kopenhaskiego.

Na pracę doktorską mgr Skubiszewskiej składa się zbiór spójnych tematycznie 4 publikacji wydanych drukiem w recenzowanych czasopismach naukowych, trzy w *International Journal of Molecular Sciences* w latach 2020-2021, jedna w *Molecules* w roku 2021. Obydwa czasopisma znajdują się na „Liście Filadelfijskiej”. Łączna wartość współczynnika wpływu (ang. *impact factor*) wynosi 23,267, zaś liczba punktów MEiN 560. We wszystkich 4 publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Fakt ten oraz dodatkowo załączone oświadczenia współautorów wskazują jednoznacznie, iż mgr Skubiszewska jest również głównym wykonawcą prac. Do odbitek publikacji, stanowiących podstawę postępowania doktorskiego mgr Skubiszewska dołączyła komentarz w języku polskim obejmujący 54 strony maszynopisu.

Wyniki badań odnoszące się do leku tiagabina Doktorantka przedstawiła w publikacjach pt. „ $K_v11.1$, $Na_v1.5$ and $Ca_v1.2$ transporter proteins as antitarget for drug cardiotoxicity” oraz “Antiepileptic drug tiagabine does not directly target key cardiac ion channels $K_v11.1$, $Na_v1.5$ and $Ca_v1.2$ ”, pierwsza wydrukowana w czasopiśmie naukowym *International Journal of Molecular Sciences*, druga w czasopiśmie *Molecules*. Pierwsza publikacja o charakterze poglądowym stanowi projekt badawczy wzbogacający i systematyzujący wiedzę na temat

szeroko rozumianej farmakologii bezpieczeństwa. Doktorantka opisała w niej w oparciu o 121 pozycji literaturowych przegląd badań kardiotoxyczności leków oraz zebrała najważniejsze informacje na temat struktury i roli kanałów jonowych obecnych w sercu, jak również mechanizmów ich działania oraz inhibicji. Dużo miejsca Autorka poświęciła kanałom jonowym potasowym (VGKCs), wapniowym (VGCaCs) i sodowym (VGNaCs) bramkowanym napięciem (VGICs, ang.: *Voltage-Gated Ion Channels*). Pracę zakończyła rozdziałem zatytułowanym "In Silico Methods Testing the Risk of Cardiotoxicity", w którym przedstawiła technikę dokowania molekularnego, określając ją jako jedną z najpopularniejszych i najdokładniejszych metod *in-silico*, pozwalających przewidzieć wiązanie cząsteczki leku z białkiem kanału jonowego oraz sposób, w jaki lek wiąże się z miejscem aktywnym białka. Publikacja poglądowa dowodzi dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do przeprowadzenia w sposób kompetentny i wiarygodny badań dla leku tiagabina, których wyniki Autorka zawarła w osobnej publikacji pt. "Antiepileptic drug tiagabine does not directly target key cardiac ion channels Kv11.1, Nav1.5 and Cav1.2"

Z literatury przedmiotu wynika, że stosowanie przez pacjentów chorych na epilepsję leku przeciwdrgawkowego tiagabina obarczone jest ryzykiem pojawienia się u nich działania ubocznego w postaci tachykardii. Co ważne, mechanizmy leżące u podstaw tego działania kardiotoxycznego pozostają dotąd nieznanne. Ponieważ zaburzenie rytmu pracy serca jest najczęściej powodowane upośledzeniem funkcji kanałów jonowych, Doktorantka w swoich badaniach przeprowadzonych *in silico* dokonała analizy interakcji pomiędzy tiagabiną i ludzkimi kanałami jonowymi hKv11.1, hCav1.2 i hNav1.5, mającymi decydujący wpływ na ryzyko wywołania arytmii. W obliczeniach Doktorantka wykorzystwała jako związki referencyjne trzy leki terfenadynę (TEF), batrachotoksynę (BTX) i nifedypinę (NFD), wszystkie charakteryzujące się dużym powinowactwem do wymienionych wyżej kanałów jonowych. Badania polegały na przeprowadzeniu dokowania molekularnego za pomocą programów AutoDock 4.2 i AutoDockTools. Dla celów obliczeniowych modele 3D protein hNav1.5 i hCav1.2 Doktorantka pozyskała z bazy Swiss Model Repository (SMR), zaś rozwiązana strukturę rentgenograficzną modelu proteiny hKv11.1 pobrała z Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB). Struktury tiagabiny oraz związków referencyjnych terfenadyny, batrachotoksyny i nifedypiny zostały pozyskane z bazy ZINC.

Uzyskane przez Doktorantkę metodami chemii obliczeniowej wartości energii kompleksów tiagabiny oraz związków referencyjnych z modelami ludzkich kanałów jonowych hKv11.1, hCav1.2 i hNav1.5 oraz obliczone wartości pK_i mniejsze od wartości progowej (< 4)

pokazały, że mechanizmy leżące u podstaw częstoskurczu u pacjentów leczonych tiagabiną wydają się nie mieć związku z wpływem tego leku na wymienione kanały jonowe serca.

Badania walidacyjne Doktorantka przeprowadziła metodami *in silico* oraz *in vivo*. W pierwszym przypadku wyniki otrzymane metodą dokowania molekularnego tiagabiny porównała z wynikami uzyskanymi dla kompleksów kontrolnych, w których rolę liganda pełniły leki progabid (PRG) i kwas acetylosalicylowy (ASA), obydwa niewykazujące powinowactwa do kanałów jonowych hNav1.5, hCav1.2 i hKv11.1. Przy wyborze związków kontrolnych Doktorantka kierowała się ich chemicznym i biologicznym podobieństwem do tiagabiny. Badania porównawcze potwierdziły, że obydwa związki kontrolne są dla wymienionych białek nieaktywnymi ligandami oraz że obliczone wartości energii wiązania (E_B) i parametru pK_i dla utworzonych kompleksów kontrolnych i kompleksów z udziałem tiagabiny są zbliżone.

Badania tiagabiny *in vivo* Doktorantka przeprowadziła we współpracy z Katedrą Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dotyczyły one oceny wpływu potencjału proarytmicznego tiagabiny na prawidłowy zapis elektrokardiogramu (EKG) u szczurów. W otrzymanym zapisie analizowano zaburzenia odcinków potencjału czynnościowego serca po podaniu leku. Badania wykazały, że zastosowanie nawet wysokich dawek tiagabiny nie zmienia w sposób znaczący zapisu EKG. Brak obserwacji wydłużenia odstępu QT sugeruje, że tiagabina nie powoduje repolaryzacji serca i prawdopodobnie nie blokuje prądów I_{KR} . Z kolei brak odstępu PQ oraz brak poszerzenia QRS odzwierciedla spowolnienie przewodzenia i zaburzenia w depolaryzacji komórek serca zwykle powodowane blokadą I_{Na} . Poczynione obserwacje pozostają w zgodzie z wynikami dokowania molekularnego, które wykazały, że tiagabina nie wiąże się z kanałami jonowymi Kv11.1 (hERG) i Nav1.5 bramkowanymi napięciem serca. Możliwość blokowania trzeciego kanału jonowego, to jest Cav1.2 przez tiagabinę Doktorantka badała na izolowanej aorcie szczura skurzonej depolaryzującym roztworem KCl. Skurcz spowodowany wzrostem stężenia pozakomórkowego potasu, prowadzi do depolaryzacji błony, co sprzyja zwiększeniu napływu wapnia ze źródeł pozakomórkowych obejmujących zależne od napięcia kanały wapniowe Cav1.2. Przeprowadzone badania wykazały, że tiagabina w badanym zakresie stężeń nie rozluźnia pierścieni aorty, co oznacza, że w tych warunkach nie wykazuje właściwości blokujących kanały wapniowe zależne od napięcia.

Wyniki badań odnoszących się do drugiego leku, to jest paroksetyny, mgr Skubiszewska zawarła w publikacjach pt. "Paroxetine – Overview of the Molecular Mechanisms of Action" oraz "Assessment of Paroxetine Molecular Interactions with Selected Monoamine and

γ -Aminobutyric Acid Transporters”, obydwu wydrukowanych w czasopiśmie naukowym *International Journal of Molecular Sciences*. Warto przypomnieć, że lek paroksetyna należy do grupy selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwytu serotoniny (SSRI) i jest stosowany w leczeniu zaburzeń lękowych, depresyjnych, obsesyjno-kompulsywnych, w terapii stresu pourazowego i objawów naczynioruchowych. Wykorzystuje się go również w praktyce klinicznej leków poza wskazaniem terapeutycznym (*off-label*) u dzieci i młodzieży.

W pierwszej publikacji o charakterze pracy pogładowej, Autorka przedstawiła w oparciu o 153 doniesienia literaturowe najważniejsze informacje dotyczące budowy chemicznej paroksetyny, jej zastosowania w leczeniu oraz farmakodynamiczną analizę mechanizmu oddziaływania leku z różnymi celami terapeutycznymi na poziomie molekularnym, takimi jak cytochromy P450, w tym szczególnie izoenzymy CYP2D6, CYP2B6 i CYP2B4, transportery monoamin (MAT), kinaza receptora sprzężonego z białkiem G (GRK2), kinazy tyrozynowa (KIT) i Janus (JAK) oraz wirus Ebola (EBOV). Praca pogładowa stanowi dobrą podstawę teoretyczną i pokazuje dobre przygotowanie Doktorantki do przeprowadzenia badań opisanych w drugiej z wymienionych wyżej publikacji, której celem było uzyskanie odpowiedzi na pytanie o możliwość działania paroksetyny w mechanizmie neurogennym. Na ten mechanizm działania paroksetyny może bowiem wskazywać obserwacja, że po podaniu leku poziom serotoniny w organizmie znacznie wzrasta już po kilku minutach, podczas gdy jego działanie przeciwdepresyjne pojawia się znacznie później, bo dopiero po kilkunastu dniach leczenia. Mechanizm działania paroksetyny nie został dotychczas w pełni poznany. Niemniej w świetle aktualnych danych literaturowych przyjmuje się, że inicjuje go wzrost stężenia neuroprzekaźników w mózgu. Z tego względu można oczekiwać, że leki stosowane w farmakoterapii chorób o etiologii wynikającej z obniżonego poziomu neuroprzekaźników przy udziale podstawowych mediatorów (SER, NE, DA, GABA) w układzie nerwowym mogą uczestniczyć w mechanizmie neurogennym. Ideą badań podjętych przez Doktorantkę była analiza interakcji pomiędzy paroksetyną a ludzkimi transporterami monoamin (hMAT: hSERT, hDAT, hNET) i kwasu γ -aminomasłowego (hGAT: hGAT1-3, hBGT1) na poziomie molekularnym, których hamowanie jest kluczowe dla zwiększenia poziomu podstawowych neuroprzekaźników w mózgu. W tym miejscu warto zauważyć, że paroksetyna nie była wcześniej poddawana tego rodzaju analizie. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania *in silico* można podzielić na dwa etapy. Pierwszy etap dotyczył analizy porównawczej struktury przestrzennej ligandów i transporterów białkowych, drugi natomiast oddziaływań pomiędzy cząsteczkami ligandu i białka transportowego, ze szczególnym uwzględnieniem wiązań

wodorowych. W badaniach interakcji ligand – transporter białkowy uwzględniono dodatkowo serotoninę, dopaminę, noradrenalinę, kwas γ -aminomasłowy, służące jak związki odniesienia. Struktury przestrzenne ligandów Doktorantka pobrała z bazy ZINC. Ich optymalizacji dokonała z wykorzystaniem programu Gaussian 09 i metody DFT/B3LYP w bazie 6-311+G(d,p) z wodą jako rozpuszczalnikiem w modelu PCM. Modele białkowych transporterów Autorka pozyskała z ogólnodostępnych baz naukowych. Rentgenograficzną strukturę białka hSERT pobrała z RCSB Protein Data Bank (PDB). W obliczeniach dla pozostałych transporterów białkowych, z uwagi na brak ich struktur rentgenograficznych, Doktorantka wykorzystwała homologiczne modele białek dostępne w bazie Swiss-Prot. Proces dokowania ligandów do celów terapeutycznych przeprowadziła Ona za pomocą programów obliczeniowych AutoDock 4.2 i AutoDockTools.

Uzyskane przez mgr Skubiszewską wyniki badań molekularnych pokazały, że paroksetyna tworzy najbardziej stabilny kompleks z białkiem transportowym serotoniny (hSERT). Z pozostałymi transporterami monoamin (MATs) lek ten również wchodzi w interakcje, jednak połączenia są zdecydowanie mniej stabilne. Jeszcze mniejszą trwałością, charakteryzują się oddziaływania paroksetyny z transporterami kwasu γ -aminomasłowego. Poczynione obserwacje pozwoliły Autorce wysunąć wniosek, że mechanizm neurogeny działania paroksetyny winien być zdeterminowany głównie hamowaniem miejsca aktywnego transportera serotoniny. Niska siła hamująca paroksetyny na izoformy ludzkiego transportera kwasu γ -aminomasłowego hGAT1 i hGAT3 poddaje w wątpliwość inicjację neurogenezy w mózgu poprzez inhibicję tych transporterów. Tym niemniej obserwowane interakcje paroksetyny z ludzkim transporterem kwasu γ -aminomasłowego można wykorzystać jako punkt wyjścia dla zaprojektowania pochodnych paroksetyny tworzących silniejsze połączenia z izoformami ludzkiego transportera GABA.

Dla weryfikacji inhibicji wychwytu zwrotnego GABA ze szczeliny synaptycznej Doktorantka przeprowadziła testy farmakologiczne. Przeprowadziła je na liniach komórkowych jajnika chomika chińskiego. Badania wykazały wysoką ekspresję izoform transportera kwasu γ -aminomasłowego (GAT's). Najwyższe wartości parametru IC_{50} , wyrażającego aktywność hamującą paroksetyny na hGAT1-3 i hBGT1, Autorka odnotowała dla transporterów hGAT1 i hGAT2. Uzyskane wyniki badań *in vitro* okazały się zgodne z wynikami uzyskanymi technikami obliczeniowymi.

Wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej mgr Skubiszewska zaprezentowała w formie komunikatu ustnego na konferencjach naukowych w Gdańsku (2018), w Toruniu (2020) i w Krakowie (2021), a także w formie plakatu na 23 konferencjach naukowych, m. in.

w Gdańsku (2018), w miejscowości Bachotek (2019), w Bydgoszczy (2021), w Krakowie (2021), w Łodzi (2020, 2021), w Poznaniu (2019) oraz Toruniu (2019–2021). Badania były częściowo finansowane przez NCN w ramach grantu UMO-2015/17/B/NZ7/02937 oraz ze środków Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach grantu z programu EIRU pt. EI DEBUTS “Finding and understanding mechanisms of action of selected compounds active on central nervous system monoamine transporters”.

Badania prowadzone przez mgr Skubiszewską posiadały charakter interdyscyplinarny. Dlatego też wymagały oprócz inicjatywy badawczej i dużej samodzielności, również umiejętności współpracy z różnymi jednostkami naukowymi. Nawiązanie współpracy z Katedrą Farmakologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Katedrą Projektowania Leków i Farmakologii Wydziału Zdrowia i Nauk Medycznych Uniwersytetu Kopenhaskiego. Centrum Bioinformatyki Uniwersytetu w Hamburgu oraz FQS Poland (Fujitsu Group) pokazało, że mgr Skubiszewska umiejętnościami takimi dysponuje.

Pozostały dorobek Doktorantki wprawdzie nie podlega ocenie, to jednak warto odnotować, że jest znaczący. Obejmuje on bowiem siedem prac oryginalnych, w których Doktorantka jest dwukrotnie pierwszym i trzykrotnie drugim autorem. Łączna wartość współczynnika oddziaływania (IF) wynosi 14,314, zaś liczba punktów MEiN 419. Doktorantka współuczestniczyła w opracowaniu trzech monografii. W latach 2018 – 2022 brała czynny udział w licznych konferencjach krajowych, na których przedstawiła 22 komunikaty naukowe w formie posteru oraz kilka komunikatów w formie ustnej. Niestety nie mogę podać liczby wystąpień ustnych Doktorantki z uwagi na brak zaznaczenia w wykazie „Udział w konferencjach i zjazdach” osoby prezentującej materiał komunikatu.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na zadanie pytań jakie nasunęły mi się podczas zapoznawania się z lekturą pracy doktorskiej:

- co miała Pani na myśli umieszczając w tytule pracy „*Badania wybranych związków o potencjalnym działaniu farmakologicznym w zaburzeniach funkcjonowania układu nerwowego*” słowo 'potencjalny',
- w publikacji, w której dokonała Pani oceny mechanizmu aktywacji neurogenezy wywołanej lekiem paroksetyna, w pierwszym etapie badań dokonała Pani analizy porównawczej struktury przestrzennej ligandów i transporterów białkowych, stwierdzając na stronie 124 publikacji, iż przyjmują one bardzo podobne konformacje w miejscu docelowym białka; czy rzeczywiście podane wartości odchylenia średniej kwadratowej (RMSD) mieszczące się w przedziale 0,1 – 1,5 świadczą o daleko idącym podobieństwie?

- jaki miało sens porównywanie aktywności enancjomerów *R*- i *S*-tiagabiny, skoro dla obydwu logarytm stałej inhibicji (pK_i) połączeń *R/S*-tiagabiny ze wszystkimi testowanymi kanałami przyjmuje wartość poniżej istotnego progu inhibicji ($pK_i \leq 4$)?

Komentarz do publikacji pod względem redakcyjnym został poprawnie opracowany.

Chociaż podczas zapoznawania się jego lekturą stwierdziłem

- niemałą liczbę błędów literowych;
- niezręczności językowe (przykłady, str. 13: ...natomiast możliwość interakcja pomiędzy PRX a hGATs jest na niższym poziomie...; str. 14: niezamierzone działania farmakologiczne substancji wywierające zaburzenia funkcji...; str. 53...pacjenci cierpiący na epilepsję mają zwiększone prawdopodobieństwo zapadania na choroby...).

Przedstawione uchybienia nie wpływają jednak na moją pozytywną wysoką ocenę pracy.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca doktorska Pani mgr Magdaleny Skubiszewskiej świadczy o dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia badań w zakresie chemii obliczeniowej. Autorka umiejętnie korzysta ze specjalistycznych programów komputerowych stosowanych w obliczeniach teoretycznych. Jednocześnie swobodnie operuje Ona terminologią z zakresu farmakologii, biologii i krystalografii białek. Uważam, że recenzowana praca spełnia wymagania prawne w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr Magdaleny Skubiszewskiej do publicznej obrony oraz o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

