



Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Zofia Rogóż

Zakład Farmakologii.

Instytut Farmakologii im Jerzego Maja

Polskiej Akademii Nauk

ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

tel. (12) 662 32 79

e-mail: rogoz@if-pan.krakow.pl

OCENA

rozprawy doktorskiej pt **”Ocena aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej analogów związku HC-030031”** wykonanej przez **Pana mgr farm. Adriana Bryle** na Wydziale Farmaceutycznym w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum, pod kierunkiem promotora Pani dr hab. n. farm. Małgorzaty Zygmunt.

Formalna charakterystyka prac

Rozprawa doktorska **Pana mgr farm. Adriana Bryle** została opracowana zgodnie z wytycznymi wynikającymi ze znowelizowanej Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14. 03. 2003 roku, z późniejszymi zmianami. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska pod tytułem **”Ocena aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej analogów związku HC-030031”** opisana jest na 104 stronach, podzielonych na 10 kolejnych rozdziałów, wyniki badań behawioralne i biochemiczne przedstawiono w 18 tabelach i na 8 rycinach oraz 18 wykresach, które wraz z 130 pozycjami aktualnego piśmiennictwa dają całościowy pogląd na aktualny stan badań w tym zakresie. Wstęp teoretyczny pracy (25 stron) z 4 tabelami i 7 rycinami stanowi kompendium wiedzy na temat etiologii i patofizjologii bólu i stanów zapalnych. W tym miejscu Doktorant podkreślił, że w etiologii i patologii bólu można wyróżnić trzy rodzaje

doznań bólowych: fizjologiczny ból z receptorów bólowych (fizjologiczny ból nocyceptywny), patofizjologiczny ból z receptorów bólowych (patofizjologiczny ból nocyceptywny, który często opisywany jest jako ból w stanach zapalnych) oraz ból neuropatyczny, powstający na skutek uszkodzenia struktur układu nerwowego. Mając na uwadze miejsce powstawania, ból można podzielić na somatyczny (w przypadku gdy wrażenia bólowe pochodzą ze skóry, mięśni, stawów, kości lub tkanki łącznej oraz trzewny. Z uwagi na czas trwania można wyróżnić ból ostry - zanikający szybko po ustaniu czynnika wywołującego oraz ból przewlekły – występujący w postaci bólów długotrwałych, trwający dłużej niż 3 miesiące) lub stale nawracających. Ponadto zapalenie i odczyn zapalny to jedne z najstarszych pojęć występujące w patofizjologii chorób i cierpienia – to immunologiczna, biochemiczne oraz hematologiczne reakcje układu odpornościowego na pojawiający się czynnik uszkadzający (wewnętrzny bądź zewnętrzny) struktury tkankowe lub narządy.

Pomimo wielu dostępnych leków stosowanych w farmakoterapii bólu i procesu zapalnego, ich skuteczność terapeutyczna nie jest w dalszym ciągu wystarczająca – szczególnie w przypadku niektórych stanów bólowych. Szybkie nabywanie tolerancji na działanie przeciwbólowe, uzależnienie od opioidowych leków przeciwbólowych oraz liczne interakcje lekowe i działania niepożądane są powodem do poszukiwania nowych bardziej skutecznych leków o innym mechanizmie działania i tym samym o większym profilu bezpieczeństwa.

Aktualny stan wiedzy oraz dane zacytowane we Wstępie pracy w pełni uzasadniają podjęcie przez **Pana mgr farm. Adriana Bryle** badań oceniających aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej 12 nowych analogów związku HC-030031 – selektywnego antagonisty kanału jonowego TRPA1, pełniącego istotną funkcję w bólu, stanach zapalnych oraz w bólu neuropatycznym. Analogi związku HC-030031 zsyntetyzowano w Katedrze Chemii Leków, Zakładu Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego CMUJ. Dla nowych związków określono (*in vitro*) właściwości hamujące aktywność ludzkiego kanału (TRPA1 (hTRPA1), metodą fluorescencyjną, poprzez kinetyczną analizę napływu jonów Ca^{2+} do transferowanych ludzkich komórek HEK-293 z użyciem wskaźnika fluorescencyjnego Fluo-4 oraz oznaczono aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej; w teście przeciągania się w teście formalinowym oraz w modelu obrzęku karageninowego. Ponadto dla wyselekcjonowanych silnie działających analogów oznaczono ich aktywność przeciwbólową w modelu bólu neuropatycznego, wpływ na poziom cytokin oraz aktywność oksydacyjną.

Przedstawione w rozprawie wyniki pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Najbardziej aktywne struktury to ksantynowe pochodne z ugrupowaniami amidowymi (**GR-858, GR- 870, MS-131**) lub hydrazydowymi (**MS-124, GRKA-12**) oraz jedna pochodna benzimidazolowa, z ugrupowaniami amidowymi (**MS-134**).
2. Aktywność przeciwbólowa oraz przeciwzapalna większości badanych związków, może wynikać z antagonistycznych właściwości w stosunku do kanału jonowego TRPA1, natomiast pozostałych (nie mających powinowactwo do kanału jonowego), z hamowania enzymu COX-1.
3. Żaden z analogów związku HC-030031, nie obniżał poziomu cytokin (TNF- α , IL-1 β oraz IL-6).
4. Wydaje się, że badane związki mogą także hamować aktywność fosfodiesterazy PDE4/7, ale potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia kolejnych badań.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przedstawione w rozprawie wyniki badań biochemicznych i behawioralnych dostarczyły informacji na temat aktywności przeciwbólowej i przeciwzapalnej 12 nowych analogów związku HC-030031 – selektywnego antagonisty kanału jonowego TRPA1, pełniącego istotną funkcję w bólu, stanach zapalnych oraz w bólu neuropatycznym. Uzyskane wyniki w istotny sposób przyczyniły się do uzupełnienia wiedzy w zakresie aktywności farmakologicznej wybranych do badań związków oraz wniosły nowe informacje dotyczące efektów 12 nowych analogów związku HC-030031, wykazujących, efekty przeciwbólowe i przeciwzapalne. Opis uzyskanych wyników, wzbogacony tabelami i rycinami oraz sposób przeprowadzenia dyskusji, w konfrontacji z osiągnięciami innych badaczy, stanowi istotne osiągnięcie Doktoranta. Rozprawa doktorska **Pana mgr farm. Adriana Bryły** dowodzi na bardzo dobre opanowania szerokiego wachlarza modeli stosowanych do oceny potencjalnego działania przeciwbólowego i przeciwzapalnego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant wykazuje umiejętność współpracy z innymi zespołami badawczymi, co jest niezwykle ważne, szczególnie w pracach badawczych mających za zadanie wprowadzenie do terapii nowego leku.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną zaplanowanych i zrealizowanych przez Doktoranta badań farmakologicznych. Do obowiązku recenzenta należy jednak wskazanie niedociągnięć zawartych w rozprawie, są one natury redakcyjnej i w niczym nie umniejszają treści merytorycznej pracy.

Doktorant na str. 37 pisze

1. „Badania przeprowadzono przy użyciu myszy Swiss Albino o masie ciała 18-28 g oraz przy użyciu szczurów szczepu Wistar o masie ciała 180-250 g. Do przeprowadzonych badań użyto jedynie szczurów”. **-nie podano do jakich badaniach użyto szczury?**
2. W opisie Tabel od 7 do 12 oraz Wykresów od 1 do 4 podano, że grupy doświadczalne liczyły 6-8 zwierząt, **nie zaznaczono czy to były myszy czy szczury.**
3. W badaniach poszerzonych we wszystkich eksperymentach użyto myszy i te informacje umieszczono w opisie Tabel i Wykresów,

Jak zaznaczono powyżej, drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy, którą uważam za ciekawą, uwzględniającą aktualną wiedzę, związaną z tak ważnym problemem jakim jest leczenie bólu i procesów zapalnych. Wyniki opisane w pracy znacznie rozszerzają możliwości badawcze w poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych metod terapii bólu i stanów zapalnych.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska **Pana mgr farm. Adriana Bryły** w pełni odpowiada wymogom sformułowanym w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych i przedkładaam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, wniosek o dopuszczenie **Pana mgr farm. Adriana Bryle** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kompleksowo zaplanowane i zrealizowane badania, ich wartość naukowa, istotna wartość metodologiczna pracy, wykraczająca ponad przeciętnie stosowane badania skriningowe, włożony wysiłek oraz zdobyte przez Doktoranta umiejętności, mogą być podstawą **wyróżnienia pracy doktorskiej Pana mgr farm. Adriana Bryle.**

Kraków, 19. 05. 2022

.....
dr hab. Zofia Rogóż