

**Prof. dr hab. Beata Stanisz**

**Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej; Uniwersytetu Medycznego im. Karola  
Marcinkowskiego, ul. Rokietnicka 3, 60-806 Poznań  
e-mail: bstanisz@ump.edu.pl, tel. 61 6418415**

---

Poznań, dnia 4.12.2023

Ocena pracy doktorskiej

**mgr Roberta Pluskoty**

pt.

**Poszukiwanie struktury wiodącej związków o potencjalnej aktywności  
antyproliferacyjnej opartej o cząsteczkę indandionu**

**ze wspomaganie technik *in silico***

wykonana pod kierunkiem Promotora

dr hab. n. farm. inż. Marcin Koba, prof. UMK

w Katedrze Toksykologii i Bromatologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w  
Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Sylwetka doktoranta - Ocena całego dorobku zawodowego i naukowego*

Doktorant, ukończył jednolite studia magisterskie w 2016 roku z oceną bardzo dobrą na kierunku analityka medyczna w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W tym samym roku rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Farmaceutycznym w Katedrze Toksykologii (obecnie Katedra Toksykologii i Bromatologii) pod kierownictwem dra hab. n. farm. inż. Marcina Koby, prof. UMK oraz pracę zawodową jako starszy technik w tejże Katedrze.

Doktorant od 2018 roku realizował się zawodowo w Spółce InventionBio oraz firmie Blirt (obecnie Qiagen Gdańsk), a od 2023 w firmie Polpharma Biologics na stanowisku DSP Process Data Lead w dziale MS&T, gdzie pracuje obecnie.

Dorobek naukowy Doktoranta wyrażony jest w postaci: 11 prac naukowych o zasięgu międzynarodowym, 6 monografii i wielu wystąpień i plakatów zjazdowych na konferencjach polskich i międzynarodowych.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania *Impact Factor* z roku opublikowania prac dla wszystkich pozycji wynosi IF: 38,523 (punktacja MNiSW: 960), co stanowi średnią na publikację równą ~3,50. To bardzo dobry wynik, stąd wyrazy mojego uznania.

### *Recenzja pracy doktorskiej*

---

W obecnych czasach obserwujemy zwiększony wzrost zachorowalności na choroby nowotworowe. Światowa Organizacja Zdrowia uznała choroby nowotworowe jako drugą przyczynę zgonów na świecie. Fakt ten skłania naukowców do poszukiwania nowych cząsteczek z różnorodnymi strukturami chemicznymi o zastosowaniu antynowotworowym. Niestety leczenie tych chorób jest trudne, gdyż nie jest łatwo otrzymać potencjalny lek, który byłby selektywny do komórek nowotworowych, ponadto w terapii nowotworowej istotnym problemem jest także lekooporność oraz interakcje lekowe.

Dlatego też, celem współczesnej chemii medycznej w obszarze terapii nowotworowej, jest poszukiwanie związków, potencjalnych leków oddziałujących na kilka receptorów/enzymów komórki nowotworowej.

Projektowanie nowych leków najkorzystniejsze jest, gdy uwzględnia się metody obliczeniowe. Pozwalają one na ocenę wielu możliwości związków chemicznych, które mogą się stać lekami, przy relatywnie małych kosztach prowadzenia tego procesu badawczego. Ponadto, metody obliczeniowe skracają czas niezbędny do wprowadzenia potencjalnych leków do praktyki klinicznej oraz umożliwiają ograniczanie lub nawet wykluczają prowadzenia badań *in vitro* i *in vivo*. Zapewniają one również możliwość zaniechania wykorzystywania zwierząt i sprawiają, że badania nie będą powodowały wątpliwości etycznych.

Dlatego też niniejszą rozprawę doktorską przyjął do oceny z dużym zainteresowaniem, z uwagi na realizowaną bardzo ważną tematykę związaną z nowoczesnym podejściem do syntezy i projektowania nowych związków o potencjalnym działaniu w chorobach nowotworowych.

W ocenianej pracy, Doktorant przedstawił możliwości w zakresie poszukiwania struktury wiodącej nowej grupy związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej o 2-podstawione pochodne indan-1,3-dionu (1,3-IND) w oparciu o dane eksperymentalne i ograniczony zbiór danych wejściowych. Pragnę dodać, że nie zdziwił mnie fakt, wybrania do badań, modelowania struktury już znanej od dawna. Większość nowopowstałych leków jest

oparta o znane już struktury chemiczne, jednakże stosując techniki *in silico* udaje się poprawić im właściwości fizykochemiczne, farmakologiczne czy toksykologiczne.

Podstawą o ubiegania się o tytuł doktora Pana Magistra są dwie wieloautorskie publikacje (P1 i P2) w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Doktorant w obu jest pierwszym autorem. Dołączone w pracy doktorskiej oświadczenia Współautorów publikacji, potwierdzają znaczącą oraz główną rolę Pana Magistra w realizację publikacji wchodzących w skład cyklu. Do każdej publikacji Doktorant zaplanował i koordynował prace badawcze, przygotowywał przegląd literaturowy, nadzorował i przeprowadzał badania w zakresie syntezy nowych związków, przeprowadził ich identyfikację nowoczesnymi metodami analitycznymi, przeprowadził wraz z oceną statyczną obliczenia, sformułował wnioski publikacyjne i przygotował publikacje do druku.

Ponadto w pracy doktorskiej, Autor zamieścił tzw. oryginalne wyniki badań, czyli w chwili składania dysertacji nie były jeszcze publikowane.

#### *Układ pracy*

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgr Roberta Pluskoty napisana jest starannie i składa się z 87 stron. Zawiera ona główne rozdziały (wstęp, część teoretyczną, cel pracy, część eksperymentalną, wnioski, streszczenia, literatura) oraz takie rozdziały jak, m.in.: wykaz stosowanych skrótów, publikacji wchodzących w skład dysertacji doktorskiej czy publikacje pełnotekstowe. W dysertacji jest także rozdział dotyczący rozwoju naukowego i zawodowego Doktoranta.

**W posumowaniu stwierdzam, że struktura pracy doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń, gdyż w ocenianej pracy doktorskiej są wszystkie niezbędne rozdziały, kolejność rozdziałów jest właściwa i logiczna.**

#### *Część literaturowa - teoretyczna*

Przedstawiona jest na 6 stronach i zredagowana została na podstawie przeglądu bieżącej literatury, tematycznie związanej z częścią badawczą pracy. Doktorant podzielił ją na cztery podrozdziały, w których przedstawił wiadomości na temat: (i) właściwości 2-podstawionych pochodnych 1,3-IND, (ii) mechanizmu syntezy 2-podstawionych pochodnych 1,3-IND, (iii) wyznaczenia lipofilności związków oraz (iv) tworzenia modeli ilościowej zależności aktywność-struktura (QSAR).

**W podsumowaniu stwierdzam, że ten syntetyczny teoretyczny rozdział dysertacji Pana mgr Roberta Pluskoty wymagał wielu przemyśleń i świadczy o doskonałym teoretycznym Jego przygotowaniu i wysokim zaangażowaniu. Ponadto jest doskonałym komentarzem do publikacji P1 i wprowadzeniem do części eksperymentalnej.**

#### *Cel pracy*

Główny cel badawczy ocenianej pracy jest bardzo jasno sformułowany. Doktorant, przy pomocy swojego Promotora postanowił: *po pierwsze* opracować, wykorzystując techniki *in silico*, sposób wytwarzania nowej grupy związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej o „na starej” strukturze 1,3-IND, *po drugie* określić potencjalną użyteczność uzyskanych struktur przed realizacją badań przedklinicznych. Doktorant w pracy opisał szczegółowo jak postanowił zrealizować w/w cele. Założył, że w trakcie realizacji niniejszej eksperymentów zostanie m.in.: (i) wyselekcjonowana struktura, która posłuży do budowania kolejnych związków chemicznych o coraz korzystniejszych właściwościach leczniczych, (ii) wyjaśniona zasadność stosowania różnych modyfikatorów organicznych w trakcie wyznaczania parametru logkw zgodnie z modelem Snydera-Soczewińskiego, (iii) wyznaczona dla opisanych pochodnych 1,3-IND baza dodatkowych parametrów pozwalających na określenie potencjału omawianych związków chemicznych do zastosowania w farmakoterapii (*ang. drug-likeness properties*). W/w cel badań wraz założeniami, Doktorant realizował w siedmiu etapach, które szczegółowo opisał w dysertacji.

**W podsumowaniu stwierdzam, że podjęcie przez Doktoranta w/w wątków badawczych, z kilku obszarów chemii medycznej uważam za uzasadnione i bardzo ciekawe i ważne z punktu widzenia zarówno naukowego jak i aplikacyjnego. O ważności wyników świadczą też dotychczasowe dwie publikacje w czasopismach o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku oddziaływania IF, a mianowicie: *Molecules* oraz *Mini-Reviews in Medical Chemistry*.**

#### *Ocena metodologii badań i wnioski*

Część eksperymentalną, Doktorant podzielił na dwa etapy, a mianowicie: (i) prace laboratoryjne oraz (ii) symulacyjno-obliczeniowe.

W pracach laboratoryjnych Doktorant dokonał:

- syntezy na drodze kondensacji aldolowej oraz oczyszczania wybranych nowosyntezowanych pochodnych, stosując metody krystalizacji, rekrystalizacji i liofilizacji, a uzyskane produkty zidentyfikował metodami NMR i MS,

- badania lipofilowości uzyskanych nowych pochodnych 2-arylopodstawionych pochodnych 1,3-IND. z wykorzystaniem RP-LC,
- wyznaczenia parametrów do oceny potencjału w farmakoterapii, m.in. oszacowano wartość dawki substancji, która zabija 50% badanej populacji (toksyczność ostra) - LD50,
- klasyfikacji uzyskanych związków ze względu na ich toksyczność ostrą,
- oceny aktywności antyproliferacyjnej wobec wybranych ssaczych linii komórkowych oraz zdolności do oddziaływania uzyskanych nowych pochodnych z białkami.

Stwierdzam, poprawność merytoryczna realizowanych eksperymentów przez Pana Magistra, ponadto dodam, że otrzymane wyniki były zweryfikowane przez niezależnych Recenzentów w procesie *peer review*, gdyż stały się one podstawą publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym *Molecules*. Jako farmaceuta i analityk, po zapoznaniu się z publikacją uważam, że wyniki zostały przedstawione rzetelnie, a wartość naukowa i aplikacyjna tej publikację jest bardzo wysoka.

Część badawczą publikacji Doktorant rozpoczyna od przedstawia opisu syntezy nowych związków, podaje wzory (symbole A-K) otrzymanych struktur 2-podstawionych pochodnych 1,3-IND, które były wykorzystywane do dalszych etapów badań. Podkreślę, że ten etap pracy wymagał nie tylko znajomości z zakresu syntezy, ale także z obszaru analizy struktur chemicznych. Doktorant wykorzystując nowoczesne metody identyfikacyjne, a mianowicie NMR i MS określił perfekcyjnie strukturę syntezowanych związków.

Kolejne wyniki przedstawione w publikacji wymagały od Doktoranta, z kolei warsztatu analityka, gdyż ocenił lipofilowość otrzymanych nowych związków metodą chromatograficzną. Po wyznaczeniu parametru lipofilowości Pan Magister uzyskał pierwszy cenny wniosek, że nowosyntezowane związki posiadają właściwości fizykochemiczne, które predestynują do stania się lekiem.

Kolejnym krokiem była ocena aktywności biologicznej. Doktorant w publikacji bardzo szeroko omówił przeprowadzone badania i otrzymane wyniki. Wykazał się bardzo dociekliwy i ostrożny w formowaniu wniosków, gdyż związki wykazywały różną aktywność biologiczną. Najkorzystniejszym z syntezowanych związków okazał się, według przeprowadzonej analizy związek 3H, gdyż pokonywał barierę krew-mózg oraz jednocześnie nie wykazywał właściwości rakotwórczych i mutagennych. Bariere krew-mózg pokonuje też pochodna o najwyższej aktywności antyproliferacyjnej – 3G, ale wstępne badania wykazały, może być rakotwórcza i/lub mutagenna. Badania te są bardzo cenne i wymagały od Doktoranta sporo wiedzy z obszaru biologiczno-farmakologiczno-toksykologicznej. Ponadto,

warto podkreślić, że w tej publikacji Doktorant nie tylko przedstawił swoje wyniki, ale także zamieścił dojrzałą pod względem naukowym i merytorycznym ich dyskusję.

Końcowe badania dotyczyły modelowania aktywności biologicznej. W pracy doktorskiej w rozdziale pt.: *Modelowanie aktywności biologicznej*, Pan Magister omówił szczegółowo wybór metodologii badań (wyniki oryginalne, niepublikowane). Doktorant zdecydował się na technikę regresji wielorakiej ze wszystkimi jej rodzajami. Metodologia ta pozwoliła na wybór trzech modeli. Dalej w tym rozdziale Doktorant szczegółowo opisuje wybrane modele, przyporządkowuje im równania matematyczne. Doktorant w pracy przedstawił oryginalne wyniki. Podkreślę fakt, że owe wyniki zostały nie tylko właściwie opatrzone dyskusją, ale także zostały uporządkowane i perfekcyjnie przedstawione na schematach, w tabeli czy wykresach. Badania te zasługują na moje uznanie. Obszar modelowania aktywności jest trudny, a analizując wyniki przedstawione przez Doktoranta nie zauważyłam błędów merytorycznych. Doceniam fakt, że Doktorant ma sporą wiedzę nie tylko syntetyczno-analityczną, ale także matematyczno-statystyczną, co potwierdził w swobodnym posługiwaniu się programami *Statistica 13.3* i *Exel*.

#### *Podsumowanie końcowe*

**Jestem przekonana, że Doktorant w pełni zrealizowała zaplanowany szeroki i nowatorski program badań, a uzyskane przez Niego wyniki zawierają elementy nowości naukowej. Na szczególną uwagę zasługuje profesjonalizm badawczy Doktoranta w różnych obszarach nauki, który zapewnił wysoką jakość i rzetelność wyników oraz umiejętność ich prawidłowej dyskusji/interpretacji.**

Moim zdaniem do najważniejszych osiągnięć Doktoranta w obszarze założonego celu badań, można zaliczyć, że:

- **struktura chemiczna 2-[(4,7-dimetoksynaftalen-1-ylo)metylideno]-1H-indeno-1,3(2H)-dion (3G): (i) jest prosta w otrzymywaniu i oczyszczaniu, (ii) cechuje się wysoką aktywnością antyproliferacyjną o charakterze przedłużonym wobec komórek raka szyjki macicy oraz ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca, (iii) ma relatywnie niską toksyczność, (iv) wykazuje aktywność po podaniu doustnym, czyli może okazać się właściwą strukturą do opracowywania nowej grupy leków przeciwnowotworowych,**
- **aktywność antyproliferacyjna 2-podstawionych pochodnych indan-1,3-dionu zależy przede wszystkim od: (i) masy cząsteczkowej, która jest zależna od ilości atomów C, (ii) lipofilowości oraz (iii) ilości wiązań w obrębie cząsteczki,**

- metody obliczeniowe do wyznaczania parametrów lipofilowości mogą zastąpić parametry wyznaczone eksperymentalnie,
- w przypadku badania związków niepolarnych do wyznaczania parametru logkw, będącego chromatograficzną interpretacją lipofilowości, lepszym modyfikatorem organicznym fazy ruchomej jest metanol niż acetonitryl.

Jako recenzent czytając pracę zauważyłam pewne określenia, które nie są zalecane w opisywaniu procedur w takich dysertacjach np., cytuję jedno z takich określeń...*półprodukt samoistnie opuszczał środowisko reakcji*, ponadto dobrze byłoby doprecyzować niektóre procedury, cytuję z pracy...*procedura odbywała się w temperaturze pokojowej z dodatkiem katalizatora*...moja sugestia o podanie temperatury i katalizatora.

Wyżej wymienione uwagi/komentarze są jedynie drobnymi sugestiami i nie wpływają na merytoryczną wartość pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Ponadto, pozwolę sobie kończąc recenzję zadać pytanie, wynikające z mojej ciekawości: *czy zastanawiał się Pan może nad realizacją badań na większą skalę, np. z przemysłem, z inną jednostką badawczą? Uzyskane wyniki Pana badań są bardzo obiecujące, dlatego szersze badania są tu jak najbardziej uzasadnione.*

**Rozprawa doktorska Pana mgr Roberta Pluskoty jest pracą nowatorską, aplikacyjną i wartościową i wnosi elementy poznawcze do obszaru nauk farmaceutycznych, czyli spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Zwracam się z prośbą do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

**Wnioskuje do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy o kontynuowanie dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

UNIWERSYTET MEDYCZNY  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej  
*Beata Stanis*  
Prof. dr hab. Beata J. Stanis