

Dr hab. n. farm. Ilona Olędzka
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Ul. Gen. J. Hallera 107
80-416 Gdańsk

Gdańsk, dnia 18.12.2023 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Roberta Pluskoty

pt. „Poszukiwanie struktury wiodącej związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej o cząsteczkę indandionu ze wspomaganiami technik *in silico*”

wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. n. farm. inż. Marcina Koby, prof. UMK
w Katedrze Toksykologii i Bromatologii, Wydziału Farmaceutycznego, Collegium Medicum im. L.
Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

W chwili obecnej modelowanie molekularne wraz z komputerowo wspomaganym projektowaniem leków jest jednym z najszybciej rozwijających się kierunków badań określanym często farmacją *in silico*. Wykorzystuje się je do selekcji związków, które z dużym prawdopodobieństwem będą wykazywały oczekiwaną aktywność farmakologiczną i dopiero tak wyselekcjonowane związki zostają poddane dalszym etapom badań.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Roberta Pluskoty nt. „Poszukiwanie struktury wiodącej związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej o cząsteczkę indandionu ze wspomaganiami technik *in silico*” dobrze wpisuje się we wspomniane zagadnienia współczesnej farmacji. Dysertacja obejmuje 57 stronicowe opracowanie zawierające spis tabel i rycin, wykaz stosowanych skrótów, wykaz publikacji stanowiących podstawę niniejszego postępowania, opis aktywności naukowej Doktoranta, wstęp, część teoretyczną, cele pracy, część eksperymentalną, wyniki i dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis literatury obejmującej 23 pozycje. Rozprawa uzupełniona jest spójnym tematycznie zestawem dwóch publikacji naukowych oraz oświadczeniami ich współautorów. Układ pracy jest przejrzysty i nie budzi ogólnie zastrzeżeń. We wspomnianych dwóch publikacjach zostały częściowo opisane wyniki badań uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej a część wyników opisano jako tekst oryginalny w niniejszej dysertacji. Artykuły naukowe zostały opublikowane na łamach międzynarodowych czasopism anglojęzycznych z listy JCR odpowiednio w roku 2018 (*Medicinal Chemistry*) oraz w roku 2021 (*Molecules*). Doktorant nie wskazuje jednak sumarycznej punktacji, która odnosi się do wyodrębnionego cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Wskazane byłoby te dane uzupełnić podczas publicznej obrony. W obu publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej Doktorant jest pierwszym autorem a oświadczenia współautorów publikacji jednoznacznie potwierdzają jego wiodącą rolę podczas planowania i koordynacji prac, przeglądu publikacji, opracowania metodologii badawczej, przeprowadzenia syntezy i oczyszczania, przeprowadzenia analizy chromatograficznej i statystycznej, wizualizacji danych i interpretacji uzyskanych wyników a także udziału w przygotowaniu manuskryptów. Rolę autora korespondencyjnego w obu pracach pełni promotor rozprawy, dr hab. Marcin Koba, prof. UMK.

Dodatkowo, z analizy aktywności naukowej wynika, że Doktorant jest współautorem 11 publikacji naukowych, 6 rozdziałów w monografiach oraz 12 doniesień konferencyjnych. Zgodnie z punktacją czasopism IF jego całkowity dorobek naukowy wynosi 38,523 (brak wskazania według jakiej bazy - *Web of Science* czy *Scopus*?) oraz 960 punktów MNiSW. Na uwagę zasługuje spore doświadczenie badawcze mgr Roberta Pluskoty w pracy z technikami stosowanymi we współczesnej diagnostyce laboratoryjnej, które zdobył podczas odbywania praktyk zawodowych, w czasie studiów doktoranckich a także doskonalać swoje umiejętności podczas pracy w Spółce InventionBio, w firmie Blirt (obecnie Qiagen w Gdańsku) czy w ostatnim okresie w firmie Polpharma Biologics. Podkreślenia wymagają także działalność organizacyjna Doktoranta oraz zdobyte nagrody. **W świetle powyższych parametrów bibliometrycznych, potwierdzających wysoki poziom naukowy badań oraz istotnej aktywności naukowej, mgr Robert Pluskota w pełni kwalifikuje się do ubiegania się o stopień naukowy doktora.**

Wspomniane artykuły naukowe, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, ukazały się w recenzowanych czasopismach gdzie zostały zrecenzowane w procesie wydawniczym. Zatem rola recenzenta dysertacji doktorskiej jest w takim wypadku związana z wykazaniem spójności tematyki tych publikacji i ich związku z założonym celem pracy a także z oceną udziału Doktoranta w ich powstaniu.

Cel badań został jasno sprecyzowany i dotyczył opracowania sposobu wytwarzania nowej grupy związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej na strukturze 1,3-indandionu z wykorzystaniem technik modelowania QSAR oraz określenia potencjalnej aplikacyjności uzyskanych struktur przed etapem badań przedklinicznych. Autor wyznaczył sobie także cele szczegółowe, które obejmowały: wyselekcjonowanie struktury służącej do projektowania związków o oczekiwanych właściwościach, wyjaśnienie celowości stosowania różnych modyfikatorów organicznych w trakcie wyznaczania parametru $\log k_w$ zgodnie z modelem Snydera-Soczewińskiego, wyznaczenie dodatkowych parametrów pozwalających na określenie potencjału omawianych pochodnych do zastosowania w farmakoterapii (rozpuszczalność, przepuszczalność, stabilność metaboliczna). I jako ostatni cel szczegółowy Doktorant wskazał wzrost świadomości (wiedzy) na temat szerokiego zakresu stosowania omawianych pochodnych wśród zespołów zajmujących się projektowaniem leków. Realizację założonych celów Doktorant zaplanował w siedmiu etapach. **W tym miejscu pragnę podkreślić trafność i aktualność wyboru tematyki badawczej w kontekście reprezentowanej dyscypliny naukowej.**

Poszukiwanie odpowiedniej struktury wiodącej następuje po rozpoznaniu potencjalnego punktu uchwytu dla leku. Związek o właściwej strukturze powinien zapewniać maksymalny efekt terapeutyczny przy jednoczesnej specyficzności działania i minimalnym wpływie na resztę ustroju. W kolejnej fazie następuje identyfikacja cząsteczek wiodących, a wśród nich wyselekcjonowanie kandydata na lek. Jest to faza badań podstawowych, która tradycyjnie polega na syntezie nowego związku, modyfikacji już istniejącego związku lub wyizolowaniu substancji naturalnych z surowców roślinnych. Właśnie ta faza może być przyspieszona przez zastosowanie komputerowych metod modelowania molekularnego a prowadzenie prac projektowych z zastosowaniem modeli komputerowych umożliwia ograniczenie lub nawet wykluczenie badań *in vitro* czy *in vivo*. Ponadto taki proces jest mniej pracochłonny a koszty nieporównywalnie niższe. Podejście zaprezentowane w niniejszej pracy dotyczy poszukiwania struktury wiodącej nowej grupy związków o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej opartej o 2-podstawione pochodne indan-1,3-dionu na podstawie danych

eksperymentalnych. Realizację celów pracy Autor rozpoczął, słusznie, od obszernego przeglądu literatury opublikowanej w okresie od lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku do chwili obecnej (3 doniesienia pochodzą z jeszcze wcześniejszego okresu), w zakresie aktywności biologicznej pochodnych 1,3-indandionu. Pozwoliło to na optymalny dobór związku wyjściowego w planowanym projekcie badawczym. Rezultaty uzyskane w tym etapie Doktorant opisał w publikacji poglądowej P1 zyskując literaturowe potwierdzenie, na temat właściwości 1,3-indandionu, związku który przyciąga uwagę badaczy ze względu na niski koszt jego pozyskania, wysoką wydajność analiz, ale przede wszystkim na możliwość uzyskania szerokiego spektrum pochodnych o potencjalnych właściwościach umożliwiających ich zastosowanie w medycynie. **Dodatkowo Doktorant odkrył niszę informacyjną na temat potwierdzenia antyproliferacyjnej aktywności badanych pochodnych.**

Prace eksperymentalne zaplanowane w ramach realizacji tematu pracy doktorskiej rozpoczęto od syntezy i oczyszczania 2-podstawionych pochodnych indan-1,3-dionu, które mogą być kandydatami na nowe leki. W porównaniu z innymi technikami opisanymi w literaturze, przedstawiona metoda syntezy jest prosta, i jak podkreśla Autor, zapewnia zadowalającą wydajność bez stosowania specjalnie dedykowanych katalizatorów. Zastosowanie kwasu octowego jako rozpuszczalnika zapewnia stosunkowo wysoką rozpuszczalność substratów i możliwość łatwego usunięcia rozpuszczalnika po zakończeniu syntezy. Wprawdzie są w literaturze doniesienia o syntezie związków 3A, 3C i 3F według podobnej metody, jednak z niewielką różnicą dotyczącą rekrytalizacji z n-oktanu. Pozostałe związki nie zostały dotychczas wytworzone przedstawioną metodą, a **związki 3D, 3G i 3K zostały zsyntetyzowane po raz pierwszy, co należy uznać za oryginalne osiągnięcie Doktoranta.**

Na wysoką ocenę zasługuje także realizacja kolejnych wyznaczonych etapów zmierzających do zaprojektowania leków *in silico* i potwierdzenia ich potencjału w farmakoterapii. Opierając się na regułach Lipińskiego i Vebera a także na modelu Snydera-Soczewińskiego, Autor wyznaczył eksperymentalnie wartości lipofilowości. Uzyskane wartości parametru $\log k_w$ różniły się w zależności od zastosowanego modyfikatora (metanol lub acetonitryl). Doktorant słusznie zwrócił uwagę, że stosowanie różnych modyfikatorów organicznych prowadzi do wyznaczenia różnych wartości $\log k_w$, które mogą pośrednio wpływać na decyzje podejmowane przez badacza. W tym miejscu mam uwagę dotyczącą błędnie stosowanego nazewnictwa. Na stronach 35 i 36 dysertacji Autor kilkakrotnie używa pojęcia „liofilowość” zamiast „lipofilowość”. Tych pojęć nie można stosować zamiennie. Doktorant udowodnił, że wybór modyfikatora może mieć wpływ na spełnienie podstawowej reguły Lipińskiego jaką jest lipofilowość dla związków, których $\log P$ jest zbliżone do 5 (związki 3D i 3I). Warto podkreślić, że wyniki uzyskane metodami obliczeniowymi z zastosowaniem parametrów ALOGP i MLOGP nie są identyczne jednak istnieje między nimi pewna korelacja (szczegóły tego porównania zostały dobrze opisane w publikacji P2). Parametry ALOGP i MLOGP są najbardziej podobne dla wszystkich związków z $\log k_w$ -MeOH i są z nim silniej skorelowane niż z $\log k_w$ -ACN. Na przykład $\log k_w$ -MeOH wskazuje, że związek 3D nie będzie biologicznie aktywny po podaniu doustnym (Fig. 4 w publikacji P2). Z kolei $\log k_w$ -ACN wskazuje, że reguła Lipińskiego jest w tym przypadku spełniona. Autor potwierdził, że możliwe jest stosowanie zamiennie parametru doświadczalnego $\log k_w$ -MeOH, ALOGP i MLOGP. Ponadto, większość badanych związków ma wartości $\log k_w$ poniżej 5 a zatem powinny swobodnie przenikać przez błony biologiczne. Pod względem masy cząsteczkowej, liczby donorów i akceptorów wiązań wodorowych, liczby wiązań wirujących oraz całkowitego obszaru polarnego otrzymane związki spełniały regułę Lipińskiego i Vebera.

Aktywność biologiczną testowanych związków Doktorant ocenił na trzech liniach komórek nowotworowych: A549 (*human lung carcinoma*), B16F10 (*mouse melanoma*) oraz HeLa (raka szyjki macicy). Wyniki wskazały, że podziały komórek linii A549 były najsilniej hamowane przez związki 3G i 3D, ale i tak mniej skutecznie niż przez związki kontrolne (kombretastatyna 4, doksorubicyna i daunorubicyna). Linia komórek B16F10 najlepiej reagowała na związki kontrolne i na związek 3F. Natomiast w przypadku linii komórek HeLa związek 3G był skuteczniejszy niż związki kontrolne. W badaniu wykazano, że największy wpływ na wybrane linie komórek nowotworowych mają związki 3F i 3G. Autor zwraca uwagę, że związek 3G najprawdopodobniej posiada zdolność przekraczania bariery krew-mózg, co może być przydatne w dalszych etapach prac nad poszukiwaniem jego zastosowania. Niestety obie struktury wiodące (3F i 3G) mogą wykazywać właściwości mutagenne. Badając zdolność zsyntetyzowanych związków do pokonywania bariery krew-mózg oraz właściwości rakotwórczych i mutagennych Doktorant zauważył, że ponad połowa uzyskanych substancji nie będzie penetrować OUN. Natomiast związek 3H pokonuje barierę krew-mózg i nie wykazuje właściwości rakotwórczych i mutagennych (wyniki przedstawiono w tabeli 5 i 6 w publikacji P2). Obiecujące były także wyniki dotyczące wiązania badanych pochodnych z albuminą jako nośnikiem leków. Frakcja wolna dla 2-podstawionych pochodnych indan-1,3-dionu wahała się od 3 do 17%, co sugeruje, że związki te będą powoli uwalniane z kompleksu z albuminą.

Ważnym etapem było opracowanie przez Doktoranta modelu do przewidywania aktywności antyproliferacyjnej badanej grupy związków. Podejście to pozwala na przewidywanie aktywności nowych związków w powiązaniu z ich budową strukturalną czyli służą do badania relacji jednej zależnej, opisującej aktywność związku, od zmiennych niezależnych, opisujących strukturę. Badane związki przedstawiono w postaci modeli trójwymiarowych, optymalizowanych geometrycznie przy pomocy oprogramowania do modelowania molekularnego HyperChem. Następnie nowe struktury poddano wyliczeniu deskryptorów molekularnych za pomocą oprogramowania Dragon. Wartości deskryptorów umożliwiają przedstawienie właściwości fizykochemicznych cząsteczek w postaci liczbowej, przez co są niezbędnym elementem składowym tworzenia ilościowego modelu aktywności. Do opracowania modelu QSAR Doktorant zastosował regresję wieloraką postępującą kroczącą, która pozwala na określenie cech cząsteczki wywierających największy wpływ na jej aktywność. Wyłonione zostały trzy modele, po jednym dla każdej zmiennej zależnej, a deskryptory równań QSAR należą do 5 grup opisujących cząsteczki na podstawie różnych algorytmów. Wyłoniono także 3 parametry równania mające najsilniejszy wpływ na wartość aktywności biologicznej omawianych związków. Były to: parametr HOMA wobec linii A549, parametr SpMax-EA(ed) wobec linii B16F10 oraz parametr H8m wobec linii HeLa. We wszystkich przypadkach korelacja była ujemna. Z kolei współczynniki korelacji gotowych modeli dla zbioru uczącego oraz dla zbioru testowego podano w tabeli 3 dysertacji.

Doktorant podjął próbę interpretacji modelu opisującego aktywność pochodnych indan-1,3-dionu wobec linii komórkowej A549 czyli ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc. Model ten cechował się najlepszymi parametrami. Z równania wynika, że na aktywność badanych związków najmocniej wpływa zmienna HOMA będąca wskaźnikiem aromatyczności, silnie skorelowanym z parametrami lipofilowości. Autor zauważa, że wartość tego parametru jest odwrotnie proporcjonalna do ilości wiązań C-C w pierścieniu co oznacza także, że wartość HOMA będzie malała wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej. Z kolei wartość MLOGP rośnie wraz z liczbą atomów węgla lub fluorowca w związku. To skłoniło Autora do wniosku, że przedstawiony cykl zależności spełnia jedno z założeń reguły

Lipińskiego czyli limit masy cząsteczkowej. A zatem aktywność antyproliferacyjna badanych związków maleje ze wzrostem parametru HOMA. Kolejnym istotnym deskryptorem opisywanego równania jest Mor22m należący do grupy molekularnych reprezentacji struktur trójwymiarowych opartych na dyfrakcji elektronowej. Wartość tego deskryptora zależy od parametru rozproszenia, odległości pomiędzy równymi atomami w cząsteczce oraz całkowitej liczby atomów w molekule. Wartość współczynnika przy deskrytorze Mor22m jest dodatnia co oznacza, że aktywność omawianych związków rośnie wraz ze wzrostem wartości $\sin s r_{ij}$ (czyli iloczynu s i r_{ij} określających odpowiednio wartość parametru rozproszenia oraz odległość między i -tym i j -tym atomem). Z kolei współczynnik przy deskrytorze L2v, który jest zaliczany do deskryptorów molekularnych WHIM, ma wartość ujemną co oznacza, że aktywność antyproliferacyjna badanych pochodnych wobec linii A549 zmniejsza się wraz ze wzrostem L2v. Deskryptor ten zawiera informacje na temat rozmiaru, kształtu, symetrii czy rozkładu atomów. Z uzyskanych danych wynika, że ze wzrostem masy cząsteczkowej związku, wzrasta objętość van der Walsa, a to obniża aktywność biologiczną omawianych związków. Cykl zależności związany z deskryptorem L2v, wynikający z interpretacji omawianego modelu, Doktorant przedstawił w sposób graficzny na rycinie 14 w dysertacji. Ostatnim deskryptorem opracowanego równania QSAR jest SM10_AEA(ri), czyli wskaźnik sąsiedztwa krawędzi gdzie cząsteczka jest reprezentowana przez teoretyczny graf będący jej projekcją. Interpretacja tego wskaźnika doprowadziła Doktoranta do wniosku, że aktywność badanych pochodnych wobec linii A549 rośnie wraz z ilością wiązań w cząsteczce. W podsumowaniu tej części badań Doktorant przedstawił uogólnioną interpretację równania QSAR, która opisuje czynniki wpływające na wzrost aktywności antyproliferacyjnej omawianych pochodnych wobec linii A549 a zebrane informacje pozwalają na wykorzystanie tej wiedzy w praktyce podczas projektowania kolejnych 2-podstawionych pochodnych indan-1,3-dionu.

Oceniając całościowo osiągnięte przez Doktoranta wyniki należy mieć na uwadze, że prowadzenie badań jest często dużym wyzwaniem analitycznym. Doktorant sprostował postawionym założeniom i zrealizował zarówno główny jak i szczegółowe cele pracy, wykazując przy tym odpowiedni poziom wiedzy i umiejętności analitycznych. Szerokie spektrum aktywności biologicznej pochodnych 1,3-indandionu spowodowało, że synteza oraz badania związków zawierających ten fragment w swojej strukturze wpisują się w aktualne trendy poszukiwania kandydatów na nowe leki o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej. Wybrane związki wydają się być wystarczająco dobrymi kandydatami na leki pod względem struktury, lipofilowości, toksyczności i aktywności biologicznej. Z analiz wynika, że najprawdopodobniej związki te mogą być biologicznie aktywne po podaniu doustnym, a błony komórkowe nie będą dla nich stanowić bariery. Doktorant wskazał, że związek 3G czyli 2-[(4,7-dimetoksynaftalen-1-yl)metylideno]-1H-indeno-1,3(2H)-dion można określić jako najlepszą wiodącą strukturę pod względem aktywności przeciwnowotworowej raka szyjki macicy a także ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc. Ponadto do oryginalnych osiągnięć Doktoranta w przedstawionej rozprawie doktorskiej zaliczyć należy także opracowanie prostej i jednocześnie wydajnej metody syntezy i oczyszczania 2-podstawionych pochodnych 1,3-indandionu oraz potwierdzenie wpływu rodzaju modyfikatora organicznego przy wyznaczaniu chromatograficznie lipofilowości. Dysertację cechuje ogólna staranność i dbałość o szczegóły. Niemniej jednak przy wnikliwym czytaniu napotyka się na liczne błędy stylistyczne i tzw. „literówki”. Ponadto, byłoby cenne odniesienie się podczas publicznej obrony do kilku kwestii, które nie zostały odpowiednio opisane w dysertacji:

1. Jakie powinny być dalsze kierunki badań dla wyselekcjonowanych kandydatów na leki? Czy związek 3H, który według uzyskanych wyników, pokonuje barierę krew-mózg i nie wykazuje właściwości rakotwórczych i mutagennych, może być rozpatrywany jako struktura wiodąca o potencjalnym działaniu antyproliferacyjnym?
2. W badaniach, do pomiaru aktywności metabolicznej komórek zastosowano protokół MTT. Najczęściej mierzonymi parametrami podczas wykonywania testów cytotoxyczości są: żywotność komórek, aktywność metaboliczna i szybkość proliferacji. Test MTT jest obecnie najczęściej stosowany do oceny działania cytotoxycznego i oparty jest na pomiarze aktywności enzymu mitochondrialnego (dehydrogenazy bursztynianowej), obecnego w żywych komórkach. Proszę o przedstawienie jakie są inne alternatywne protokoły badań cytotoxyczości?
3. Czy Doktorant może wskazać na czym polega potencjalny mechanizm działania antyproliferacyjnego omawianych pochodnych? Czy literatura naukowa wskazuje jakieś dane?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawę doktorską cechuje wysoki poziom prowadzonych badań naukowych, prawidłowe zaprojektowanie eksperymentów oraz wnikliwa dyskusja otrzymanych wyników a wymienione drobne uchybienia nie umniejszają merytorycznej strony i wysokiej oceny dysertacji. W mojej opinii Doktorant wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych a jego wkład w rozwój metodologii dotyczącej rozwiązania problemu naukowego jest oryginalny i istotny. Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską i przedstawionymi publikacjami stwierdzam, że spełnione zostały wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w art. 187 ust. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (tj. Dz. U. 2018 poz 1668 z późniejszymi zmianami) a dorobek naukowy Kandydata uzasadnia nadanie Mu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, o dopuszczenie Pana mgr Roberta Pluskoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ilona Oledzka