

Ocena pracy doktorskiej

Mgr Pauliny Szatkowskiej-Wandas

pt.

**Zastosowanie chemometrycznej analizy danych retencji
chromatograficznej i modelowania molekularnego do oceny aktywności
biologicznej związków przeciwnowotworowych**

wykonana pod kierunkiem

dra hab. n. farm. inż. Marcina Koba

w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Mikołaja
Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Recenzja

Rozprawę doktorską pt.: *Zastosowanie chemometrycznej analizy danych retencji chromatograficznej i modelowania molekularnego do oceny aktywności biologicznej związków przeciwnowotworowych* przyjąłem do oceny z dużym zainteresowaniem ze względu na kompleksowe podejście do tematyki związanej z modelowaniem cząsteczek.

Choroby nowotworowe stanowią poważny problem współczesnego społeczeństwa i są jedną z podstawowych przyczyn zgonów na świecie.

W Polsce stanowią drugą co do częstości, zaraz po chorobach układu krążenia, przyczynę umieralności, zarówno wśród mężczyzn (26,4%) jak i wśród kobiet (22,8%).

Występują trzy główne metody postępowania w chorobach nowotworowych, a mianowicie interwencja chirurgiczna, radioterapia i farmakoterapia do której zaliczamy chemioterapię, hormonoterapię i immunoterapię.

Farmakoterapia – chemioterapia - jest główną samodzielną metodą leczenia jedynie kilku typów nowotworów, natomiast rośnie częstość jej stosowania jako terapii wspomagającej leczenie chirurgiczne lub radiologiczne w wielu rodzajach nowotworów. Nadrzędnym celem

chemioterapii jest zniszczenie w ustroju wszystkich komórek nowotworowych. Natomiast główną jej zaletą jest możliwość stosowania w leczeniu nowotworów o charakterze rozległym bądź przerzutowym, podczas gdy zabieg chirurgiczny czy też radioterapia ograniczają się jedynie do leczenia ognisk miejscowych. Jednym z pierwszych chemioterapeutyków była chlormetyna, którą zastosowano po raz pierwszy w 1946 roku u chorych na chłoniaki złośliwe. Można więc zauważyć, że chemioterapia w leczeniu nowotworów jest starą metodą ale najczęściej wykorzystywaną.

Chemioterapię obecnie łączy się także z terapią hormonalną co daje możliwość wydłużenia życia u pacjentek np. z nowotworem piersi. Politerapii nie można uniknąć w praktyce klinicznej, naraża jednak chorego na zwiększone ryzyko występowania działań niepożądanych leków w wyniku niezamierzonych interakcji pomiędzy nimi.

Obecnie stosowane leki w chemioterapii wykazują sporo działań niepożądanych, dlatego też prowadzone są nieustannie badania nad cytostatykami, aby zsyntezować cząsteczkę o korzystniejszych parametrach farmakokinetycznych i o niskiej toksyczności systemowej.

Przedstawiona do recenzji praca, doskonale wpisuje się w nurt powyższej tematyki. Ma układ spójnego tematycznie zbioru publikacji co jest zgodne z art. 13 Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Fundamentem niniejszej rozprawy doktorskiej są trzy publikacje w recenzowanych, o zasięgu międzynarodowym czasopismach, o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 3,45$ co odpowiada punktacji KBN 55.

Wyniki Doktorantka opublikowała w latach 2014-2016 w czasopismach *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening (D1)*, *Letters in Drug Design&Discovery (D2)* i *Medicinal Chemistry (D3)*.

Publikacje te są pracami zbiorowymi, stąd w pracy Doktorantka zamieściła stosowne oświadczenia z których jednoznacznie wynika, że Pani Magister jest głównym, wiodącym autorem i jej wkład polegał na wykonywaniu analiz chromatograficznych, wyznaczaniu równań opisujących zależność pomiędzy aktywnością biologiczną a strukturą badanych związków oraz opisywaniu i dyskusji otrzymywanych wyników. Udział w publikacjach Doktorantki wynosi od 50% (D1 i D2 publikacja) do 70% (D3 publikacja). Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich manuskryptach Pani magister jest pierwszym autorem.

W tym miejscu chciałam także dodać, że całkowity dorobek naukowy Doktorantki jest znacznie bogatszy i współczynnik oddziaływania wynosi 7,649. Świadczy to, że Doktorantka

nie tylko jest specjalistką w obszarze realizowania własnego doktoratu ale ma znacznie szersze zainteresowania naukowo-badawcze.

Wyniki badań realizowane w ramach pracy doktorskiej zostały już opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, dlatego jestem przekonana, że ich poprawność merytoryczna wraz z interpretacją, została już zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, dlatego też, jako recenzent dokonam jedynie analizy zawartości poszczególnych publikacji pod kątem ich spójności tematycznej oraz aplikacyjności.

Z przyjemnością czytałam i analizowałam publikacje, które stały się fundamentem doktoratu. Uważam, że cykl przedstawionych prac stanowi spójną całość zarówno w obszarze materiału do badań, metod analitycznych oraz wykorzystywanych testów statystycznych. Każda z załączonych w pracy doktorskiej publikacji dostarcza nowych informacji na temat modelowania molekularnego.

Aby mógł powstać spójny cykl publikacji Doktorantka mgr Paulina Szatkowska-Wandas przy pomocy swego Promotora dra hab. n. farm. Inż. Marcina Koba, niekwestionowanego autorytetu w płaszczyźnie modelowania molekularnego, musiała określić cel swoich badań. Wg mojej opinii, Pani Magister właściwie go sprecyzowała.

Głównym nurtem badań było sprawdzenie możliwości zastosowania połączonej strategii QSAR i QSRR do przewidywania aktywności przeciwnowotworowych związków pochodnych akrydonu i innych 15 cytostatyków aktualnie stosowanych w terapii nowotworów. Ponadto w swoich badaniach w ramach pracy doktorskiej Autorka postanowiła sprawdzić czy połączona strategia QSAR i QSRR wymaga przeprowadzenia eksperymentów doświadczalnych (badań biologicznych, chromatograficznych) czy też nie.

Zauważyłam, że cel pracy jest bardzo rozbudowany i aby Recenzent i potencjalny Czytelnik nie czuł się zagubiony, Autorka bardzo słusznie, w pracy wymieniła pięć etapów wg których realizowała założony cel doktoratu.

Jako Recenzent uważam, że takie przedstawienie celu jest bardzo korzystne, ponadto zamieszczenie schematu dodatkowo ułatwiło mi dokładniejszą analizę części badawczej pracy.

Część badawczą Doktorantka oparła na analizie zależności struktura-aktywność i struktura-retencja związków pochodnych akrydonu (publikacja D1 i D2) i 15 leków aktualnie stosowanych w chemioterapii przeciwnowotworowej m.in. Nimustynę, Aktynomycynę D. Irynotekan, Daunorubicynę, Vinkrystynę, Vinblastynę itd. (publikacja D3). Do badań Autorka

wybrała celowo leki – cytostatyki, które wykazują znaczące różnice w strukturze chemicznej. Ponadto różniły się masami cząsteczkowymi oraz mechanizmami działania farmakologicznego.

Uważam, że dobór związków do analizy był bardzo trafiony, gdyż ustalanie zależności matematycznych dla heterogennej grupy związków jest na pewno trudniejsze, jednak umożliwia określenie cenniejszych, z punktu widzenia nauki, wniosków (publikacja D3). Dodam jeszcze, że Autorka w takich badaniach jest pionierem, gdyż z przeglądu piśmiennictwa wynika, że podobne zależności matematyczne są obliczane, ale przede wszystkim dla związków charakteryzujących się licznymi podobieństwami strukturalnymi.

Do badań eksperymentalnych, jako narzędzie badawcze – analityczne wykorzystano metodę chromatograficzną. Analizy chromatograficzne przeprowadzono wykorzystując różne fazy stacjonarne: powszechne kolumny typu C8, C18, kolumny bardziej specyficzne typu HILIC a także modyfikowane fazy stacjonarne, których zadaniem było imitowanie właściwości membran biologicznych.

Dodam jako Recenzent, że wyniki otrzymane podczas realizacji tego etapu badań Doktorantka przedstawiła szczegółowo w sposób perfekcyjny i komunikatywny w publikacji D1, D2 i D3. Większość wyników została przedstawiona w tabelach co ułatwia zrozumienie i analizowanie tej części eksperymentalnej.

Kolejny etap realizowania pracy doktorskiej dotyczył wyznaczenia danych retencyjnych. Wykorzystując program *DryLab* Doktorantka otrzymała szereg chromatograficznych parametrów określających lipofilowość, które z kolei stanowiły niezbędne dane do analizy QSAR. Analiza QSAR pozwoliła opracować modele deskryptywne, w których aktywność badanych cząsteczek zestawiono z parametrami lipofilowości otrzymanymi eksperymentalnie metodą HPLC, które także wyznaczono obliczeniowo w analizie QSRR.

Należy tu podkreślić, o ważności tych analiz, gdyż bardzo istotne są informacje dotyczące lipofilowości cząsteczek substancji leczniczych, gdyż ona decyduje w dużym stopniu o przenikaniu przez dwuwarstwowe błony biologiczne.

W podsumowaniu części badawczej dodam, że założony cel badań przy pomocy Promotora o dużym doświadczeniu naukowym w obszarze takowych badań, a także dzięki wykorzystaniu metody chemometrycznej – wielorakiej regresji liniowej – oraz odpowiednich algorytmów

statystycznych i programów komputerowych, został w pełni zrealizowany a szczegółowe wnioski są zawarte w publikacjach.

Jako recenzent podkreślę, że Doktorantka poprzez swoje badania jednoznacznie określiła, że połączona strategia QSAR i QSRR to dobre narzędzie do modelowania molekularnego pochodnych o pożądanej aktywności biologicznej. Ponadto Doktorantka przedstawiła bardzo cenny wniosek, w którym stwierdziła, że prezentowana metoda (algorytm) połączonej strategii QSAR i QSRR pozwala przewidywać wartości aktywności biologicznej (model QSAR) na podstawie przewidzianych wcześniej parametrów lipofilowości (model QSRR), czyli pozwala to zmniejszyć ilość analiz chromatograficznych oraz badań *in vitro* i *in vivo* standardowo wykonywanych. Połączona strategia QSAR i QSRR pozwoliła wyznaczyć modele deskryptywne pozwalające na przewidywanie zdolności akrydonów do fizykochemicznego oddziaływania z helisą DNA, zdolności akrydonów do tworzenia kowalencyjnych międzyniciowych wiązań sieciujących DNA czy aktywności cytostatycznych leków z różnych grup, różniących się pod względem budowy jak i mechanizmów działania.

W recenzowanej pracy doktorskiej, oprócz komentarza do zamieszczonych kopii publikacji są następujące rozdziały, podobne jak w klasycznych dysertacjach, a mianowicie: spis tabel, wstęp z częścią teoretyczną, cel pracy, część eksperymentalna, dyskusja wyników i wniosków, streszczenie, summary, spis literatury.

Moim zdaniem wstęp i część teoretyczna została przygotowana przez Doktorantkę bardzo starannie i liczy 20 stron. Napisana została na podstawie 110 pozycji literaturowych, większości z ostatnich 10 lat. Piśmiennictwo do części teoretycznej jest właściwie dobrane i cytowane. Część teoretyczna składa się z trzech bardzo ciekawych rozdziałów.

Jest to kompendium informacji na temat problemów farmakoterapii onkologicznej, współczesnych metod projektowania nowych preparatów leczniczych oraz zastosowania metod chemometrycznych w poszukiwaniu leków o określonej aktywności biologicznej.

Z części teoretycznej dowiadujemy się, że problemy farmakoterapii onkologicznej narzucają naukowcom pracę w kierunku projektowania nowych skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków, obecnie chemioterapia onkologiczna opiera się na kilkunastu cytostatykach, które charakteryzują się licznymi skutkami ubocznymi. Autorka przedstawiła podział cytostatyków, zwracając uwagę na zjawisko wielolekooporności. W kolejnym rozdziale Doktorantka omówiła trudne, kosztowne, wieloetapowe i długoterminowe badania związane z projektowaniem nowych związków – potencjalnych leków. Ostatni rozdział z kolei poświęcony jest metodom chemometrycznym w poszukiwaniu leków o określonej aktywności

biologicznej. W tym rozdziale Autorka zwróciła uwagę na metody statystyczne, m.in. na metodę regresji wielorakiej, analizę składowych głównych PCA, metodą częściowych najmniejszych kwadratów. Opracowane rozdziały teoretyczne świadczą o dużym zaangażowaniu Doktorantki w tematykę objętą pracą doktorską.

W podsumowaniu części teoretycznej i eksperymentalnej mogę jednoznacznie stwierdzić, że praca doktorska Pani mgr Pauliny Szatkowskiej-Wandas jest bardzo wartościowa i zawiera wiele cennych wniosków odnośnie modelowania molekularnego do oceny aktywności biologicznej związków przeciwnowotworowych.

Trudno w tej pracy znaleźć słabe strony. Jako recenzent zauważyłam nieliczne błędy stylistyczne (np. w ciągu ostatniego roku), skróty myślowe (np. chromatograficzne parametry lipofilowości) i tzw. nieliczne literówki, jeśli mogę, to chciałam się zapytać, czy podobne badania będą przeprowadzane z innymi związkami? oraz w ramach jakich projektów badawczych były realizowane te badania?

Wniosek końcowy

Praca Pani mgr Pauliny Szatkowskiej-Wandas ma aspekty oryginalności naukowej i jest połączeniem wyników eksperymentalnych z analizą matematyczną. Autorka wykazała się bardzo dobrą umiejętnością w interpretacji zależności matematycznych. Doktorantka realizując przy pomocy swojego Promotora bardzo trudny temat modelowania molekularnego do oceny potencjalnych nowych leków wykorzystywanych w onkologii na pewno przyczyniła się do rozwoju nauk farmaceutycznych. Recenzując tę dysertację zwróciłam też uwagę na aspekt nie tylko naukowy ale także praktyczny.

Jako recenzent po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Pauliny Szatkowskiej-Wandas przygotowaną pod opieką dra hab. Marcina Koba w Katedrze i Zakładzie Toksykologii mam zaszczyt stwierdzić, że w pełni spełnia wymagania ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim i proszę Wysoką Radę Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Szatkowskiej-Wandas do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Beata Stanisz
Dr hab. n. farm. Beata Stanisz prof. UM