

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Beaty Bettiny Donarskiej
pt. „Projektowanie i synteza nowych inhibitorów elastazy pochodnych talidomidu
i ich aktywność przeciwnowotworowa”**

wykonana w oparciu o uchwałę nr 70/2024 Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne
w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
z dnia 16 lipca 2024 roku

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, pod opieką merytoryczną dr. hab. Krzysztofa Z. Łączkowskiego, prof. UMK. Jej podstawę stanowi cykl czterech spójnych tematycznie publikacji, w tym jednej przeglądowej oraz trzech twórczych, wskazany jako osiągnięcie naukowe w rozumieniu Ustawy. Łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor IF*) publikacji wynosi 18.515, co stanowi 480 punktów ministerialnych:

1. **publikacja przeglądowa:** Donarska B., Łączkowski K.Z. Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry* **2020**, 12(20), 1809-1813.
- publikacje twórcze powstałe w efekcie badań eksperymentalnych:**
2. Donarska B., Świtalska M., Płaziński W., Wietrzyk J., Łączkowski K.Z. Effect of the dichloro-substitution on antiproliferative activity of phthalimide-thiazole derivatives. Rational design, synthesis, elastase, caspase 3/7, and EGFR tyrosine kinase activity and molecular modeling study. *Bioorganic Chemistry* **2021**, 110, 104819.
3. Donarska B., Świtalska M., Wietrzyk J., Płaziński W., Łączkowski K.Z. Spectrofluorimetric and computational investigation of new phthalimide derivatives towards human neutrophil elastase inhibition and antiproliferative activity. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24(1), 110.
4. Donarska B., Sławińska-Brych A., Mizerska-Kowalska M, Zdzisińska B., Płaziński W., Łączkowski K.Z. Thalidomide derivatives as nanomolar human neutrophil elastase inhibitors: Rational design, synthesis, antiproliferative activity and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry* **2023**, 138, 106608.

Publikacje są współautorskie. W każdej z nich mgr Donarska jest pierwszym autorem, zaś w tej opublikowanej na łamach czasopisma *Bioorganic Chemistry* (2023, 138, 106608) również autorem korespondencyjnym. Doktorantka przedstawiła oświadczenia współautorów

publikacji o ich roli oraz wkładzie merytorycznym. Analiza oświadczeń potwierdza wiodący wkład mgr Donarskiej w powstanie każdej z nich. Wedle deklaracji doktorantki został on oszacowany na 60 – 95%.

Formalna ocena rozprawy doktorskiej

Oceniane dzieło prócz kopii ww. publikacji oraz wspomnianych oświadczeń współautorów zawiera obszerny wstęp literaturowy (rozdział II. Część teoretyczna) utrzymany w kontekście tematyki badawczej podjętej w ramach rozprawy doktorskiej. Tym samym wstęp ten poświęcony jest (i) zastosowaniu talidomidu i jego analogów w medycynie, (ii) obszernej charakterystyce neutrofilowej elastazy, w tym jej roli w homeostazie, patomechanizmie chorób zapalnych, rozwoju chorób nowotworowych, (iii) bardzo zgrubnej charakterystyce technik hybrydyzacji molekularnej mającej zastosowanie w procesie racjonalnego projektowania leków oraz (iv) charakterystyce układów farmakoforowych o aktywności przeciwnowotworowej oraz inhibitorowej wobec neutrofilowej elastazy.

Prócz wspomnianego wstępu literaturowego, rozprawa doktorska mgr Donarskiej zawiera także obszerny i szczegółowy opis zastosowanych metod badawczych (rozdział IV. Część eksperymentalna), komentarz prezentujący omówienie wyników badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej (rozdział V. Opis przeprowadzonych badań i dyskusja uzyskanych wyników – cykl publikacji) wraz z wnioskami (rozdział VI). Całość opatrzona jest spisem treści, wykazem skrótów, zgrabnym wprowadzeniem (rozdział I) oraz dobrze zredagowanym celem pracy (rozdział III), streszczeniem w języku polskim i angielskim, spisem rycin i tabel, wykazem dotychczasowego dorobku naukowego oraz bibliografią liczącą aż sto dziewiętnaście pozycji literaturowych.

Pod względem formalno-warsztatowym rozprawa jest na bardzo wysokim poziomie. Napisana została bardzo dobrą polszczyzną. Jest zrozumiała i czyta się ją bardzo dobrze. Sporadycznie zdarzają się tzw. literówki lub błędy interpunkcyjne, które nie wymagają szerszego komentarza. Potencjalnym obszarem do poprawy rozprawy mogłoby być bardziej szczegółowe omówienie w *Części teoretycznej* zagadnienia dedykowanego racjonalnemu projektowaniu przeciwnowotworowych cząsteczek hybrydowych (patrz: *rozdział II.3. Hybrydyzacja molekularna w projektowaniu leków przeciwnowotworowych*). Pozwolę sobie również odnieść się do osi konstrukcyjnej recenzowanego doktoratu – nie jestem bowiem do końca przekonana czy umieszczenie publikacji przeglądowej tworzącej cykl stanowiący oceniane dzieło w *Części teoretycznej* (s. 24) było słusznym rozwiązaniem dla zachowania ciągłości wywodu prowadzonego w rozprawie.

Ocena merytoryczna rozprawy

Prowadząc badania z perspektywy obranych zamierzeń badawczych, autorka recenzowanej rozprawy doktorskiej przyjęła jako ich cel zasadniczy zaprojektowanie oraz syntezę nowych pochodnych talidomidu o aktywności przeciwnowotworowej, których molekularny mechanizm działania wynikałby ze zdolności do hamowania aktywności elastazy. Tak postawiony cel badawczy został z pełnym sukcesem osiągnięty poprzez realizację siedmiu zadań szczegółowych obejmujących w szczególności: (i) racjonalne zaprojektowanie oraz syntezę pochodnych talidomidu; (ii) ocenę aktywności antyproliferacyjnej otrzymanych związków wobec linii komórek nowotworowych oraz (iii) ocenę ich toksyczności wobec linii komórek prawidłowych; (iv) wstępną ocenę potencjału przeciwnowotworowego wytypowanych struktur, jak również (v) oszacowanie ich właściwości inhibitorowych wobec

elastazy (wraz z kinetyką reakcji inhibicji) oraz (vi) stabilności chemicznej; (vii) obliczenia mechanistyczne mające na celu zaproponowanie, w oparciu o symulacje oddziaływań białko – inhibitor, molekularnego mechanizmu aktywności inhibitorowej zaprojektowanych układów hybrydowych wobec elastazy.

Obrany cel badawczy doktorantka zrealizowała w ramach owocnej, wieloosrodkowej współpracy z naukowcami polskiego obszaru nauki, w tym w ramach ścisłej współpracy z naukowcami (i) Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, (ii) Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, (iii) Katedry Biologii Komórki Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie oraz (iv) Katedry Wirusologii i Immunologii Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie. Deklarowany wkład współautorów w powstanie cyklu stanowiącego oceniane dzieło ograniczał się zasadniczo do wykonania pomiarów biologicznych, zamiennie nadzoru nad ich realizacją.

Nie zgłaszam uwag do cyklu artykułów stanowiących trzon dzieła przedstawionego do oceny. Na uznanie zasługuje fakt, że artykuły te zostały opublikowane w kolejności poznawczej. Fakt ten świadczy o bardzo dojrzałym warsztacie naukowym doktorantki. I tak – jak na pracę o charakterze eksperymentalnym przystało – przed przystąpieniem do prac badawczych mgr Donarska podjęła się skutecznej próby skatalogowania właściwości inhibitorowych azotowych związków heteroorganicznych wobec neutrofilowej elastazy w oparciu o rzetelnie zebraną literaturę z lat 2011-2020. Tym oto sposobem cykl stanowiący oceniane dzieło otwiera artykuł przeglądowy opublikowany na łamach czasopisma *Future Medicinal Chemistry* (2020, 12(20), 1809-1813), wprowadzający czytelnika w przedmiot rozważań.

Druga z cyklu prac jest już artykułem oryginalnym, w którym przedstawiono obiecujące wyniki poszerzonych badań aktywności przeciwnowotworowej oraz inhibitorowej wobec elastazy (wraz z pełną charakterystyką kinetyki reakcji inhibicji) niepisanych dotychczas w literaturze przedmiotu ftalimidowo-tiazolowych zasad Schiffa. Na podstawie eksperymentów autorzy (dokorantka najpewniej???) sformułowali wniosek, że obecność ugrupowania 3,4- lub 3,5-dichlorofenyłowego wywiera istotny wpływ na aktywność antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych oraz na hamowanie aktywności enzymatycznej elastazy. W kontekście uzyskanych wyników badań nie za bardzo rozumiem jednak przesłania wyrażonego przez doktorantkę na stronie 68, cyt.: „Największy wpływ na aktywność kaspazy miał związek 6e zawierający podstawnik 3,4-dichlorofenyłowy. (...) Interesujący jest fakt, że związek 6f (3,5-dichloro-) wykazujący podobnie, jak związek 6e (3,4-dichloro-) wysoką aktywność antyproliferacyjną oraz hamującą elastazę, nie wykazał zdolności do aktywacji kaspazy 3/7, co potwierdza znaczący wpływ rodzaju podstawnika w pierścieniu fenyłowym na aktywność tych związków (...)” i o szerszy komentarz w tej materii będę prosiła podczas publicznej obrony. Pozostając przy wątpliwościach – trudno również zgodzić się z przyjętą przez doktorantkę koncepcją badawczą (patrz rozdział III. Cel pracy), w myśl której wyniki dokowania miałyby stanowić merytoryczne przesłanki dla racjonalnego zaprojektowania strukturalnych analogów. Jak bowiem wynika z lektury kolejnego artykułu, pozyskana wiedza z mechanistycznych badań *in silico* odnośnie sposobu oddziaływania hybryd ftalimidowo-tiazolowych z wnęką wiążącą elastazy (patrz strona 68), podobnie zresztą jak i wyniki analiz zależności pomiędzy strukturą molekularną a bioaktywnością, nie znalazły bezpośredniego

zastosowania dla otrzymania strukturalnych analogów, będących przedmiotem rozważań w artykule zamieszczonym na łamach czasopisma *International Journal of Molecular Sciences* (2023, 24(1), 110).

Jak nadmieniono powyżej, kolejny z artykułów w cyklu jest raportem wyników badań z zakresu oceny potencjału przeciwnowotworowego, stabilności chemicznej oraz aktywności inhibitorowej wobec elastazy dla serii strukturalnie zmodyfikowanych (w szczególności na linkerach) hybryd ftalimidowo-tiazolowych. W toku podjętych prac badawczych wykazano (co generalnie jest zjawiskiem dość często obserwowanym w analizach typu (*quantitative*) *structure-activity relationship* (Q)SAR models) brak jednoznacznej korelacji pomiędzy strukturą molekularną a potencjałem antyproliferacyjnym, jak również pomiędzy aktywnością inhibitorową a wynikami symulacji oddziaływań ligand – białko. Co istotne, wyniki badań mechanistycznych wskazują, że sposób oddziaływań hybryd ftalimidowo-tiazolowych z elastazą wydaje się być dość odmienny od tego zaproponowanego dla ftalimidowo-tiazolowych zasad Schiffa, pomimo faktu, że związki hybrydowe obu serii wykazały mieszany mechanizm inhibicji w testach enzymatycznych. W kontekście tym, brakuje mi w przedłożonej do oceny rozprawie szerszego, bardziej uogólnionego, bardziej uniwersalnego komentarza odnośnie proponowanego sposobu wiązania hybryd ftalimidowo-tiazolowych z kieszenią wiążącą elastazy. Taki komentarz z całą pewnością stanowiłyby istotny wątek rozprawy, a w szczególności byłby on niezwykle cenny dla naukowców z obszaru chemii medycznej zajmujących się na co dzień szeroko rozumianym racjonalnym projektowaniem struktur chemicznych o znaczeniu terapeutycznym.

Ostatni z artykułów w cyklu opublikowany na łamach czasopisma *Bioorganic Chemistry* (2023, 138, 106608) dedykowany jest niskocząsteczkowym hybrydom ftalimidowo-azetydynodionowym jako nanomolowym inhibitorom elastazy. Zgodnie z deklaracją doktorantki, zsyntetyzowane struktury chemiczne zostały zaprojektowane (z pełnym sukcesem) *de novo*, w oparciu o wiedzę literaturową na temat sposobu oddziaływań ugrupowania ftalimidowego oraz 3,3-dietyloazetydino-2,4-dionowego z miejscem aktywnym białka. Podjęte następnie prace eksperymentalne pozwoliły na wyłonienie struktury wiodącej, wyselekcjonowanie związków do dalszych pogłębionych badań biologicznych *in vivo* oraz (a przynajmniej taką mam nadzieję) podjęcia prób krystalizacji kompleksu elastaza–inhibitor. Obiecujące wyniki przedstawione w artykule zamykającym cykl publikacji przedstawionych do postępowania o stopień doktora stanowią niezwykle inspirujący i obiecujący nurt do dalszych prac badawczych. Biorąc bowiem pod uwagę fakt, że fizjologicznym następstwem utraty kontroli nad aktywnością neutrofilowej elastazy może być rozwój nie tylko procesu nowotworowego, lecz również szeregu chorób układu immunologicznego, układu oddechowego, czy też zaburzeń charakteryzujących się przewlekłym stanem zapalnym, prace badawcze dedykowane poszukiwaniom nietoksycznych inhibitorów pozwalających na kontrolę aktywności enzymatycznej neutrofilowej elastazy stanowią ważne wyzwanie dla współczesnej chemii medycznej, zarówno w aspekcie czysto poznawczym, jak i (potencjalnie) aplikacyjnym.

Zalety rozprawy doktorskiej

Z czysto praktycznego punktu widzenia najważniejszą zaletą przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej jest systemowe opracowanie niskocząsteczkowych, stabilnych chemicznie, nietoksycznych hybrydowych związków heteroorganicznych opartych o motyw talidomidu, posiadających zdolność do hamowania aktywności enzymatycznej neutrofilowej elastazy w zakresie stężeń nanomolowych. Biorąc pod uwagę destrukcyjny charakter neutrofilowej elastazy, niezwykle wartościowe dla współczesnej chemii medycznej stanowią również poruszane w artykułach rozważania z zakresu jakościowych zależności pomiędzy strukturą molekularną a aktywnością biologiczną, w tym zarówno aktywnością inhibitorową wobec elastazy, jak i aktywnością antyproliferacyjną wobec komórek nowotworowych.

Spójność, szerokość projektu tworzącego cykl, dojrzałość warsztatowa doktorantki to kolejny wart podkreślenia element. Wkład w proces przygotowania artykułów doktorantka wskazuje jako zdecydowanie większościowy – współautorka wykonała m.in. część syntetyczną i enzymatyczną badań oraz przygotowała teksty publikacji, współpracowała problem badawczy i metodologię badań syntetycznych, analizowała i interpretowała dane oraz przygotowała odpowiedzi dla recenzentów. Wkład promotora dysertacji został określony jako opieka merytoryczna, współpracowanie problemu badawczego, udoskonalanie manuskryptów oraz korespondencja z wydawnictwem. Można więc uznać, że przedstawiony do oceny cykl publikacji opatrzony tytułem „Projektowanie i synteza nowych inhibitorów elastazy pochodnych talidomidu i ich aktywność przeciwnowotworowa” jest bliższy raczej spełnieniu ustawowych wymagań stawianych osiągnięciom przedstawianym do postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, aniżeli tym stawianym rozprawom doktorskim.

Wniosek końcowy

Z pełnym uznaniem odnoszę się do tematyki rozprawy doktorskiej, którą poczytuję za niezwykle spójną, ambitną, dojrzałą i daleką od przeciętnej na tym etapie aktywności naukowej. Doktorantka w sposób profesjonalny postawiła problem badawczy, dobrze zaplanowała, a następnie konsekwentnie zrealizowała postawione zadania badawcze, dowodząc tym samym opanowania zasad pracy naukowej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że zgodnie z rozumieniem art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, przedmiotowa rozprawa z dużym naddatkiem odpowiada wymogom formalnym i merytorycznym stawianym kandydatom do stopnia naukowego doktora i stanowi rzetelne, oryginalne i wartościowe poznawczo rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzające ogólną wiedzę doktorantki z obszarów syntetycznej chemii organicznej oraz chemii medycznej, a także zaświadczające o umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Mając na uwadze powyższe, wnioskuję o dopuszczenie mgr Beaty Bettiny Donarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wagę uzyskanych wyników, dojrzałość naukową i warsztatową doktorantki, wnoszę również o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy. Stosowny wniosek w tej sprawie przedkładam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej w Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu odrębnym pismem, załączonym do recenzji.

panewski agota