

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Beaty Bettiny Donarskiej pt. „Projektowanie i synteza nowych inhibitorów elastazy pochodnych talidomidu i ich aktywność przeciwnowotworowa” wykonanej w Katedrze Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy pod kierunkiem dr hab. inż. Krzysztofa Łączkowskiego prof. UMK

Historia talidomidu stanowi wyjątkowy przykład porażki ale i jednocześnie sukcesu nauki. Wprawdzie, twierdzenie takie może wydawać się prowokacyjne, a co najmniej kontrowersyjne. Należy jednak pamiętać że po pierwsze do porażki przyczynili się w znacznym stopniu ekonomiści, mimo że nie można oczywiście przemilczeć tego, że związek ten nie został wystarczająco przebadany w momencie wprowadzania na rynek. Co więcej niektóre dane mogące budzić zastrzeżenia co do jego bezpieczeństwa zostały zignorowane przez większość badaczy. Czujność Frances Kelsey pozwoliła uchronić przynajmniej społeczeństwo amerykańskie przed dramatycznymi skutkami ubocznymi tego leku. Z drugiej strony talidomid po ponad 30 latach od wycofania został ponownie wprowadzony do leczenia, przy czym potencjalny zakres zastosowania tego leku obejmuje choroby autoimmunologiczne i onkologiczne. Znaczenie tego faktu jest tym większe, że stał się on nową strukturą wiodącą o nowym celu molekularnym. Optymalizacja struktury talidomidu doprowadziła do powstania nowych leków o działaniu immunostymulującym i przeciwzapalnym stosowanych w leczeniu nowotworów. W nurt badań nad strukturą i działaniem talidomidu wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Beaty Donarskiej. Autorka podjęła próby otrzymania nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym łącząc fragmenty strukturalne talidomidu oraz układów o znanej aktywności hamującej elastazę neutrofilową, ważny cel molekularny w terapii nowotworów.

Badania te należy uznać za aktualne i potrzebne, a strategia wybrana dla realizacji celu wpisuje się również w nowoczesne trendy w chemii medycznej.

Przedstawiona mi do recenzji praca stanowi komentarz do monotematycznego cyklu czterech publikacji, które ukazały się w dobrych czasopismach z zakresu chemii medycznej, farmakologii oraz chemii organicznej. Warto wspomnieć, że całościowy dorobek autorki jest znacznie bogatszy obejmuje bowiem 16 publikacji, z czego połowa stanowi prace opublikowane w periodykach naukowych o międzynarodowym zasięgu. Autorka wybrała dość nietypową formułę w organizacji swojej rozprawy. Przedruki czterech prac stanowiących cykl są przetykane komentarzem i opisem głównych wyników tamże opublikowanych. Wprawdzie znacznie utrudnia to poruszanie się po całej pracy jeśli koncentrujemy się na konkretnych, wybranych faktach ale bardzo ułatwia zrozumienie jak realizowane były kolejne zadania. Oświadczenia o wkładzie współautorów dołączone na końcu rozprawy nie budzą zastrzeżeń co do znacznego wkładu doktorantki w powstanie tych prac. Część badań była prowadzona we współpracy z Instytutem Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, Instytutem Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej oraz Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk.

W swoich badaniach Pani Donarska zaprojektowała szereg nowych pochodnych ftalimidu wykorzystując strategię hybrydyzacji molekularnej wspomaganą dokowaniem molekularnym do modelu elastazy neutrofilowej. Otrzymywane związki były badane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej na szeregu linii ludzkich komórek nowotworowych. W badaniach tych uwzględniono również określenie toksyczności wobec komórek normalnych oraz weryfikację mechanizmu działania zwłaszcza w odniesieniu do receptora EGFR oraz elastazy. Zdolność do inhibicji tej ostatniej oznaczano dwiema metodami spektrofotometrycznie wobec świńskiej elastazy trzustkowej oraz fluorescencyjnie wobec ludzkiej elastazy neutrofilowej. Szkoda że autorka nie przedyskutowała różnic w obu metodach. Czy wynikały one z ograniczeń obu enzymów/protokołów?



W pierwszej pracy eksperymentalnej otrzymano szereg 14 pochodnych ftalimidu posiadających charakter zasad Schiffa, a obejmujący w sumie trzy serie strukturalnych analogów. Otrzymane związki wykazały dobrą aktywność przeciwnowotworową, zależną od linii komórkowej oraz rodzaju podstawników. Wykazano również, że związki charakteryzowały się mieszaną inhibicją elastazy, a wyniki hamowania enzymu dobrze korelowały z danymi uzyskanymi z dokowania molekularnego. Wyniki z tej pracy autorka wykorzystała podczas projektowania związków opisanych w kolejnej publikacji. Otrzymała w jej ramach serię dziewięciu pochodnych ftalimidu o uproszczonej strukturze, z pierścieniem tiazolu jako łącznikiem i fragmentami halogenofenolu. Związki wykazały przyzwoitą aktywność względem komórek nowotworowych oraz zdolność hamowania elastazy. W dyskusji tych wyników pojawia się stwierdzenie że stabilność otrzymanych związków na poziomie  $t_{1/2}=38$  min jest wysoka. Wprawdzie nie jest to wartość wykluczająca zastosowanie farmaceutyczne dla danego związku, jednak określenie „wysoka” wydaje się być cokolwiek na wyrost. Tym bardziej, że w świetle badań aktywności antyproliferacyjnej gdzie komórki poddaje inkubacji ze związkami przez okres 72h taka stabilność może znacząco wpływać na otrzymywane wyniki.

W kolejnej pracy eksperymentalnej wybrano nowy fragment azetydino-2,4-dionu jako układ farmakoforu  $\beta$ -laktamu według literatury. Aktywność antyproliferacyjna otrzymanych układów była na poziomie mikromolowym, w większości przypadków znacząco lepsza niż talidomidu czy jego analogów lenalidomidu oraz pomalidomidu. Ich selektywność względem komórek zdrowych również była lepsza niż standardowych leków, choć indeks selektywności na poziomie 2-4 trudno uznać za bardzo dobry. Na uwagę zasługuje niewątpliwie znacząca poprawa hamowania elastazy, przebadana wobec ludzkiej elastazy neutrofilowej. Aktywność większości związków, wyrażona parametrem  $IC_{50}$  mieściła się w zakresie nanomolowch stężeń. Równie ciekawe są wyniki dokowania do kieszeni enzymu. Związki czwartej serii mogły lokować się na dwa sposoby w kieszeni aktywnej, co uwzględniono wymuszając odpowiednie ułożenie struktury inhibitora. Analiza wartości energii dla poszczególnych układów wskazuje wyraźnie, że wprowadzenie fragmentu azetydino-2,4-dionu jest właściwym podejściem. Podobnie jak w poprzednich pracach wyniki z dokowań nie tylko pozwoliły wyjaśnić obserwowane blokowanie aktywności enzymu ale również dobrze korelowały z danymi eksperymentów *in vitro*. Bardzo dobre parametry związków z ostatniej pracy potwierdzają również wyniki z badań stabilności, znacznie przekraczającej pochodne tiazolu.



Reasumując Pani mgr Beata Donarska otrzymała w sumie 29 nowych nieopisanych dotychczas w literaturze naukowej związków, w zdecydowanej większości w wyniku wieloetapowych syntez. Związki te zostały w ramach współpracy zbadane pod kątem aktywności antyproliferacyjnej na panelu linii ludzkich komórek nowotworowych. Związki te były projektowane pod kątem powinowactwa do elastazy neutrofilowej oraz badane wobec tego enzymu w warunkach *in vitro*. Najbardziej aktywne związki wykazały aktywność przeciwnowotworową przekraczającą znacznie wyjściowy talidomid oraz jego pochodne. Prace opublikowane przez Panią mgr Donarską stanowią ważny wkład w badania inhibitorów elastazy oraz możliwości wykorzystania ich w leczeniu nowotworów. Kandydatka we wszystkich pracach jest pierwszym autorem, co potwierdza jej głębokie zaangażowanie w prace zespołu. W trakcie swoich badań wykazała się umiejętnościami projektowania związków oraz planowania skomplikowanych syntez. Wszystkie prace powstały w interdyscyplinarnym zespole. Należy też zauważyć, że całościowy dorobek kandydatki jest znacznie bogatszy obejmując sześć prac nieujętych w ramach cyklu, doniesienia konferencyjne a także prawo własności intelektualnej obejmujące najbardziej aktywny inhibitor elastazy. Wszystko to potwierdza, że Pani mgr Beata Donarska jest ukształtowanym młodym badaczem o bogatym warsztacie i właściwej postawie naukowej. Do podobnych wniosków prowadzi analiza przewodnika, który został napisany przejrzyście, poprawnym językiem z dbałością o szczegóły. W trakcie analizy dokonań kandydatki natrafiłem na nieliczne fragmenty budzące zastrzeżenie czy wymagające dodatkowego komentarza.

Numeracja związków na rycinach jest niespójna. Prawdopodobnie autorka zastosowała numerację ze źródłowych publikacji. Takie rozwiązanie jest wprawdzie łatwe ale może utrudniać czytelnikowi zorientowanie się w treści. Przykładowo na stronach 37 i 41 mamy dwie różne struktury oznaczone jako 3c. W opisie metod badawczych testy aktywności antyproliferacyjnej mogły zostać opisane bardziej szczegółowo. Brak np. parametrów utrzymywania hodowli, inkubacji z badanymi związkami. Wprawdzie wszystkie te informacje są dostępne w publikacjach wchodzących w skład cyklu, tam jest się jednak skazanym na, niejednokrotnie żmudne, szukanie. Wnioski przedstawiane na stronie 110 to właściwie wypunktowane wyniki, brakuje pełnego podsumowania i wniosków oraz perspektyw jakie, zdaniem autorki, otwierają jej badania. Moje powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy Pani mgr Donarskiej.

Przedstawiona mi do recenzji praca **spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu.

*Robert Alusić*