UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Samodzielna Pracownia Biotechnologii
15-089 Białystok , ul. Kilińskiego 1
Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-57-18

aniabiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska **Białystok, 30.06.2016.**

Ocena pracy doktorskiej mgr Beaty Powroźnik pt. "Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych"

Wprowadzenie na rynek nowego leku jest niezwykle kosztownym procesem. Koszty te nie rozkładają się równomiernie na poszczególne etapy badań potencjalnej substancji leczniczej i wdrażania leku. Większość z nich pochłania przygotowanie i przeprowadzenie całości procedury badań przedklinicznych i klinicznych zgodnie z obowiązującymi – coraz surowszymi zarówno pod kątem naukowym, jak i etycznym – procedurami i zasadami. Znaczny wzrost wymagań, stawianych nowym lekom przez agencje rejestrujące (FDA, EMEA), dotyczących m.in. ocenie mutagenności, skutkuje zwiększeniem odsetka związków odrzucanych na kolejnych etapach rozwoju. Im szybciej zostanie odkryte działanie, czy właściwości związku uniemożliwiające zastosowanie go w lecznictwie, tym szybciej nowy lek trawi na rynek. Zachodzi potrzeba zastosowania technik i narzędzi umożliwiających odrzucenie badanych związków na możliwie początkowym etapie procesu rozwoju leku, zanim osiągnie on etap kosztownych badań klinicznych.

Istnieje możliwość zastosowania metod *in silico* we wczesnych badaniach, nawet jeszcze przed zsyntetyzowaniem cząstki. Zastosowanie modelowania komputerowego podczas badań nad bezpieczeństwem potencjalnych leków pozwala wskazać obszary wymagające dokładnego potwierdzenia doświadczalnego w modelach *in vitro* oraz *in vivo*. Powoduje to, że do badań klinicznych dochodzą cząstki bezpieczniejsze oraz z dużą szansą na

spełnienie wymogów agencji rejestrujących leki. Wyznaczenie właściwości toksycznych i działań niepożądanych jest niezwykle trudnym i złożonym zadaniem. Określenie „toksyczność" obejmuje szeroki zakres efektów. Niejednokrotnie zbliżone strukturalnie cząstki mogą powodować różne efekty toksyczne. W badaniach prowadzonych początkowo w warunkach *in silico*, później *in vitro*, i na końcu *in vivo* określa się między innymi: działanie kancerogenne, kardiotoksyczne, hepatotoksyczne, drażniące na skórę i na oko, teratogenność, hematotoksyczność, neurotoksyczność, nefrotoksyczność, działanie fototoksyczne i fotouczulające.

Aktualnie prawodawstwo europejskie i amerykańskie kładzie duży nacisk na walidację metod alternatywnych, służących ocenie bezpieczeństwa wprowadzanych leków i środków diagnostycznych. Wiodącą podstawą aksjologiczną standardu jest zasada 3R (od ang. *replacement, reduction, refinement)* czyli – zastąpienia, zmniejszenia i doskonalenia zwierząt laboratoryjnych. Wytyczne OECD dotyczące metod oceny bezpieczeństwa potencjalnych leków, kładą duży nacisk na rozwój i walidację metod alternatywnych w stosunku do badań na zwierzętach. Ocena właściwości mutagennych i genotoksycznych jest jednym z obowiązkowych etapów postępowania przy wprowadzaniu do badań klinicznych nowych substancji o potencjalnym działaniu terapeutycznym. Właśnie te zagadnienia stanowią tematykę przedstawionej pracy doktorskiej. Wybór tematu pracy doktorskiej jest więc ważny i aktualny, o dużych walorach zarówno poznawczych jak i praktycznych.

Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z klasycznym podziałem na rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, piśmiennictwo, spis tabel i rysunków, streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawa doktorska mgr Beaty Powroźnik liczy 132 strony tekstu, w których zawartych jest 19 rycin i 19 tabel. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w czasie czytania. Praca ma klarowną strukturę i jest napisana wyśmienicie pod względem stylistycznym i językowym. Doktorantka posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Praca odznacza się niezwykłą starannością, zwraca uwagę szata graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo zebrane w kolejności alfabetycznej, jest właściwie dobrane i cytowane.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autorka szczegółowo omawia zagadnienia dotyczące alternatywnych badań mutagenności i genotoksyczności. Autorka rozprawy doktorskiej omawia aspekty prawne dotyczące badania mutagenności i genotoksyczności, w tym testy dotyczące tych badań rekomendowane przez UE i OECD. Materiał zawarty w tej

części pracy jest oparty na dogłębnej analizie prac badawczych z ostatnich lat i stanowi zdaniem Recenzentki wyczerpujące wprowadzenie do części doświadczalnej. Podsumowując, rozdział ten świadczy o doskonałej znajomości aktualnego piśmiennictwa, dużej wiedzy i bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki do podjętych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Beaty Powroźnik pt. "Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych" jest ocena właściwości mutagennych i genotoksycznych 36 nowych związków chemicznych o ustalonej aktywności w ośrodkowym układzie nerwowym wybranymi metodami *in silico* oraz *in vitro*. Pierwsza grupa badanych związków obejmuje 20 chiralnych i achiralnych pochodnych różnych aroksyalkiloaminoalkanoli. Ich aktywność przeciwdrgawkowa została potwierdzona w badaniach farmakologicznych *in vivo* w ramach Programu Rozwojowego Leków Przeciwpadaczkowych (*Antiepileptic Drug Development Program*, ADD) realizowanego w amerykańskim Narodowym Instytucie Zdrowia (NIH) w Rockville. Drugą grupę badanych związków stanowi 16 nowych sulfonamidowych pochodnych aryloksyetyloamin alicyklicznych (**21-28**) oraz sulfonamidowych pochodnych arypiprazolu (**29-36**) o wieloreceptorowym mechanizmie działania; wykazujących potencjał terapeutyczny w leczeniu afektywnych schorzeń typu depresyjnego, lękowego oraz schorzeń psychotycznych.

Kolejny rozdział „Metody" został opracowany przejrzyście i zawiera dokładne opisy wykorzystanych w badaniach roztworów i stosowanych testów. Jest to niezmiernie istotne dla oceny rzetelności i powtarzalności przeprowadzonych badań. Rozdział „Wyniki" zawierający wiele rycin i tabel stanowi obszerną i ciekawą poznawczo część pracy. Ryciny, tabele i wykresy są czytelne i klarowne. Wyniki przedstawiono w sposób uporządkowany, zgodny z układem przedstawionym w rozdziale poświęconym metodyce badań. Autorka pracy doktorskiej dokonała prawidłowej oceny statystycznej wyników korzystając z programu *Statistica10.2*, wykorzystała test ANOVA oraz test Dunetta.

Doktorantka dokonała wstępnej oceny toksyczności badanych związków przy użyciu programu komputerowego OSIRIS Property Explorer. Dzięki temu mogła wstępnie oszacować na podstawie struktury chemicznej takie parametry toksyczności jak: mutagenność, kancerogenność, teratogenność oraz właściwości drażniące. Jakkolwiek modelowanie i predykcja toksyczności w warunkach *in silico* nie jest jeszcze metodą rutynowo stosowaną podczas badań nad lekiem, to wyniki podobnych doświadczeń są już wykorzystywane np. przez amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA), Narodowy Instytut Zdrowia (NIH). czy instytucje rejestrujące leki podczas procesu decyzyjnego. Dane

uzyskane w wyniku modelowania komputerowego są brane pod uwagę, gdy wyniki badań bezpieczeństwa leku nie są jednoznaczne, jak również wówczas, gdy zachodzi konieczność podjęcia decyzji w sytuacji braku wszystkich pożądanych informacji na temat bezpieczeństwa. Wyniki modelowania w warunkach *in silico* dla strukturalnie podobnych związków i predykcja efektów toksycznych i klinicznych pozwalają również uniknąć dodatkowych cykli oceny toksyczności leku. Stąd wynika rosnące w ostatnim czasie zainteresowanie metodami *in silico* oferującymi możliwość skriningu znacznie większej liczby związków potencjalnie aktywnych w relatywnie krótkim czasie.

Na podstawie przeprowadzonej przez Doktorantkę analizy *in silico* przy użyciu programu OSIRIS wynika, że tylko dla czterech, spośród badanych 36 związków, istnieje prawdopodobieństwo wywołania efektu mutagennego. Są to związki, **15** i **20** w grupie aminoalkanoli oraz **33 i 34** w grupie sulfonamidowych pochodnych arypiprazolu. Wszystkie pochodne aminoalkanoli **1-20** zostały wskazane, jako te, które są obciążone potencjałem drażniącym, w przeciwieństwie do pochodnych arypiprazolu **29-36.** Z analizy przeprowadzonej przy użyciu programu OSIRIS związek **15** został wskazany jako struktura, o aktywności mutagennej, kancerogennej, drażniącej oraz teratogennej. Wynik badań *in silico* nie zostały w pełni potwierdzone w badaniach *in vitro*.

Rakotwórczość związków chemicznych można ustalać na podstawie badań epidemiologicznych, które są jednak badaniami bardzo długimi (trwają latami) i niezwykle drogimi. Inną metodą są testy biologiczne na zwierzętach, które są również czasochłonne, drogie i niejednoznaczne etycznie. Wobec czego, zastosowanie szybkich i tanich testów biologicznych opartych na wykorzystaniu drobnoustrojów do wstępnej chociażby oceny potencjalnych kancerogenów i mutagenów, stanowi bardzo cenną alternatywę.

Istnieje wiele odmian testów mutacji bakteryjnej, ale najczęściej stosowanym jest test Ames'a. Test ten jest wykorzystywany przez wiele laboratoriów i służy wykrywaniu mutacji powrotnych u bakterii *Salmonella typhimurium*. Otrzymane wyniki posłużyły do utworzenia licznych baz danych dotyczących właściwości mutagennych wielu związków chemicznych. W ramach pracy doktorskiej Autorka dokonała oceny mutatagenności badanych związków przy użyciu testu Amesa, jak również oceniła przydatność mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do szybkiej przesiewowej oceny właściwości mutagennych nowych związków chemicznych o aktywności biologicznej. Czułość testu *Vibrio harveyi* jest porównywalna z czułością testu Amesa, a w przypadku niektórych mutagenów może być wyższa. Można to wytłumaczyć znacznie większą przepuszczalnością otoczki *V. harveyi* dla dużych molekuł, w porównaniu do otoczki *Salmonella typhimurium*. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr

Beata Powroźnik opracowała również mikropłytkowy test *Vibrio harveyi*, pozwalający na wstępną ocenę działania mutagennego nowych połączeń chemicznych o aktywności biologicznej. Jest to niezwykle cenne, gdyż testy mikropłytkowe pozwalają oszczędzać zarówno czas, jak i odczynniki. Wydaje się, że również test Amesa Doktorantka mogła wykonać w wersji mikropłytkowej, co umożliwiłoby szybką ocenę aktywności mutagennej badanych związków.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza wyników mutagenności w oparciu o wartość współczynnika MI, jak również na podstawie analizy statystycznej związków **1-36** zarówno w teście Amesa, jak i *Vibrio harveyi* dowiodła, że badane związki nie są obdarzone aktywnością mutagenną. Rzetelność i wiarygodność wyników uzyskanych w teście *Vibrio harveyi* Doktorantka zweryfikowała także przez porównanie z danymi otrzymanymi w teście SOS/*umu*. Badane związki (**3-5**, **7-12**, **14-28**) w stężeniach 4 μg% i 50 μg% nie wykazywały potencjału genotoksycznego. Jedynie związek **12** w wyższym stężeniu posiadał właściwości cytotoksyczne, co mogłoby skutkować poważnymi zaburzeniami na poziomie tkankowym.

Mgr Beata Powroźnik zbadała właściwości antymutagennych połączeń **1-4**, **6**, **10**, **11**, **13**, **14**, **15**, **18**, **20-22**, **24**, **26**, **28**, **29**, **32-36**, wykorzystując modyfikacje testu Amesa i *Vibrio harveyi*. Okazało się, że związki te zarówno w teście Amesa, jak i *Vibrio harveyi* wykazywały umiarkowane i silne działanie antymutagenne odpowiednio wobec szczepów *S. typhimurium* TA100 oraz *V. harveyi*: BB7, BB7M, BB7XM, BB7X. Bardzo silnym działaniem antymutagennym w obu przeprowadzonych testach charakteryzowały się dwie pochodne z grupy aminoalkanoli: (*R*)-2-(2-(2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy)etyloamino)propan-1-ol (**1**), (*S*)-2-(2-(2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy)etyloamino)propan-1-ol (**2**) oraz związek (*N*-(3-(4-(2,3-dichlorofenylo)piperazin-1-yl)propylo)-7-chinolinosulfonamid) (**33**) należący do grupy pochodnych arypiprazolu. Związki te rokują bardzo dobrze, jako jedyne wykazywały wysoki procent hamowania potencjału mutagennego w stosunku do wszystkich testowanych szczepów. Otrzymane wyniki skłaniają do dalszych poszerzonych badań nad ich mechanizmem działania chemoprewencyjnego. Związki te można uznać za struktury wiodące, które mogą podlegać dalszej optymalizacji w celu osiągnięcia jeszcze korzystniejszego działania antymutagennego.

W rozdziale „Dyskusja" Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę uzyskanych wyników. Wnioski kończące pracę wynikają z przeprowadzonych badań i odpowiadają postawionym celom. Czytelnik może odczuwać jednak pewien niedosyt związany z brakiem konfrontacji badań własnych z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Należałoby bardziej wyeksponować oryginalny wkład Doktorantki w rozwój metod badawczych w

zakresie aktywności mutagennej i antymutagennej. Przestawiony wniosek 4 "Potwierdzono, że metody *in silico* pomagają wstępnie oszacować właściwości mutagenne, ale wyniki muszą być weryfikowane danymi eksperymentalnymi" ma zbyt ogólny charakter, gdyż z jednej strony Doktorantka korzystała tylko z jednego programu komputerowego, zaś z drugiej strony, zawsze badania *in silico* muszą być potwierdzone badaniami zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Interesującym byłoby kontynuowanie w przyszłości badań zawartych w rozprawie doktorskiej i skonfrontowanie ich skuteczności z innymi testami genotoksyczności i mutagenności rekomendowanymi przez OECD i UE.

Praca doktorska mgr Beaty Powroźnik rodzi kilka pytań. Najważniejsze z nich to:

1. Czy możliwe jest zastosowanie metod badawczych opracowanych przez Doktorantkę do wszystkich klas związków biologicznie aktywnych np. cytotoksycznych, czy też tylko do wybranych klas związków?
2. Jakie są dodatkowe ograniczenia opracowanego przez Doktorantkę mikropłytkowego testu mutagenności *Vibrio harveyi*?

Można uznać, że choć podjęte przez doktorantkę badania mają charakter podstawowy mogą mieć one konsekwencje aplikacyjne. Połączenie tych dwóch cech stanowi o poważnym ciężarze gatunkowym wyników przedstawionych w pracy. Należy wspomnieć, że cześć przedstawionych w rozprawie doktorskiej wyników badań została opublikowana w dwóch pracach: w Bioorg Med Chem, czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu o znacznym współczynniku oddziaływania (IF=2,793, 30 punktów MNiSW) oraz w J Appl Genet. (IF= 1,477, 20 punktów MNiSW). Mgr Beata Powroźnik jest również drugim autorem pracy poglądowej dotyczącej mechanizmów działania związków o aktywności antymutagennej opublikowanej w J Appl Genet. Łączny IF wszystkich prac składających się na przedstawioną rozprawę doktorską, łącznie z pracą poglądową wynosi 5.747 (70 punktów MNiSW). Należy również zaznaczyć, że Jej dorobek znacznie wykracza poza standardowe minimum wymagań stawianych kandydatom na stopień doktora. Mgr Beata Powroźnik jest bowiem autorem, lub współautorem innych prac nie włączonych do pracy doktorskiej. Łączny dorobek naukowy Doktoranki obejmuje prace o współczynniku oddziaływania IF=15,153 (180 punktów MNiSW). Wysoki, jak na doktoranta jest także Index Hirscha, który wynosi 4.

Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Beaty Powroźnik pt. "Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość praktyczną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i

opanowania tematu przez Doktorantkę. Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam za niezwykle interesującą oraz nowatorską. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i spełnia wymogi określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Ze względu na te walory, pragnę rekomendować rozprawę doktorską Beaty Powroźnik pt. "Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych" do wyróżnienia.

Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Beaty Powroźnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Biotechnologii
Anna Bielawska
prof. dr hab. Anna Bielawska