WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Powroźnik,
p.t. „Ocena mutagenności i antymutagenności związków o zdefiniowanej aktywności biologicznej z wykorzystaniem testów alternatywnych",
wykonanej w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego
Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum
Promotor dr hab. Elżbieta Pękala, prof. UJ

Celem badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr Beaty Powroźnik było oszacowanie własności mutagennych i genotoksycznych szeregu aktywnych biologicznie nowych związków – potencjalnych leków. W tym celu Doktorantka postanowiła wykorzystać wybrane modele *in silico* i *in vitro* alternatywne w stosunku do badań na zwierzętach. Autorka zaplanowała weryfikację osiąganych wyników eksperymentów poprzez porównanie z danymi uzyskanymi w innych modelach badawczych oraz przeprowadzenie modyfikacji metodyki wybranego testu mutagenności *in vitro*. Wykorzystała również testy *in vitro* do oznaczenia antymutagenności badanych związków.

Ocena mutagenności i genotoksyczności jest wymaganym i niezbędnym etapem rozwoju nowego leku. Istnieje więc potrzeba opracowania i stosowania szybkich i względnie tanich testów przesiewowych. Wytyczne OECD dotyczące metod oceny bezpieczeństwa związków chemicznych kładą nacisk, o czym pisze we wstępie do rozprawy Doktorantka, na rozwój i walidację metod alternatywnych w stosunku do badań na zwierzętach. Tematyka podjęta przez Doktorantkę jest więc niezwykle aktualna i dotyczy poszukiwania szybkich i tanich metod alternatywnych, do zastosowania we wczesnych etapach badań nad rozwojem nowego leku. Przeprowadzone badania mają również istotny aspekt aplikacyjny: przedmiot badań stanowiły nowe związki o zdefiniowanej aktywności w ośrodkowym

układzie nerwowym. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki przyczyniły się więc do selekcji potencjalnych leków do dalszych badań przedklinicznych.

Uzasadnieniem zainteresowania wybraną tematyką badawczą jest opracowany przez Doktorantkę obszerny wstęp do rozprawy. Autorka definiuje w nim pojęcia genotoksyczności i mutagenności, oraz analizuje mechanizmy tych procesów. Główną uwagę poświęca jednak alternatywnym metodom oceny toksyczności potencjalnych leków. Autorka przedstawia najważniejsze wymogi europejskiego standardu badań na zwierzętach oraz informacje zawarte w wytycznych OECD oraz ICH, dotyczące metod oceny bezpieczeństwa substancji chemicznych. Następnie definiuje, czym są metody alternatywne badania genotoksyczności i mutagenności i obszernie analizuje stosowane metody badań *in vitro*, w tym modele prokariotyczne oraz eukariotyczne (z wykorzystaniem grzybów, muszki owocowej i linii komórkowych). Osobny podrozdział Doktorantka poświęca metodom badań *in silico* oraz stosowanym programom komputerowym. Kolejny fragment przeglądu literaturowego poświęcony jest aspektom prawnym badania mutagenności i genotoksyczności potencjalnych substancji leczniczych.

Zaprezentowany w dysertacji przegląd piśmiennictwa jest bardzo szeroki; obejmuje 184 pozycje, w wysokim procencie opublikowane w okresie ostatnich 5 lat. Stanowi on czytelną podstawę dla postawionej przez doktorantkę hipotezy badawczej. Z uznaniem pragnę podkreślić, że wśród cytowanego piśmiennictwa znajdują się dwie pozycje współautorstwa Doktorantki oraz promotora niniejszej pracy – prof. dr hab. Elżbiety Pękala.

Głównym celem ocenianej rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań szacujących właściwości genotoksyczne i mutagenne dla 29 nowych związków otrzymanych na drodze syntezy w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM (pochodne aminoalkanolowe) oraz w Zakładzie Chemii Leków Katedry Chemii Farmaceutycznej UJ CM (sulfonamidowe pochodne aryloksyetylowe amin alicyklicznych oraz sulfonamidowe pochodne arypiprazolu). Pośród badanych związków 12 było związkami chiralnymi. Osiem spośród związków chiralnych było badanych wyłącznie w postaci mieszaniny racemicznej, trzy w postaci izomerów R, S, oraz mieszaniny racemicznej a jeden wyłącznie w postaci rozdzielonych izomerów R i S. W sumie Doktorantka przeprowadziła więc badania 36 substancji. Wszystkie badane związki wykazały we wcześniej przeprowadzonych badaniach biologicznych aktywność w ośrodkowym układzie nerwowym, odpowiednio: przeciwdrgawkową oraz przeciwdepresyjną, przeciwlękową

i przeciwpsychotyczną. Podjęcie przez mgr Beatę Powroźnik badań genotoksyczności i mutagenności tych związków było więc celowe i stanowiło bardzo istotny element badań przedklinicznych potencjalnych leków.

Biorąc pod uwagę cel i stosowaną metodykę, badania własne Autorki można podzielić na trzy kolejne etapy. Pierwszy etap pracy polegał na wstępnej ocenie toksyczności badanych związków metodami *in silico,* przy użyciu programu OSIRIS Property Explorer. Spośród analizowanych struktur wytypowane zostały cztery – dwie pochodne aminoalkanoli oraz dwie sulfonamidowe pochodne arypiprazolu – dla których istniało umiarkowane prawdopodobieństwo wywołania efektu mutagennego. Wszystkie pochodne aminoalkanoli były też obciążone potencjałem drażniącym. Dla związku z tej grupy oznaczonego numerem 15 program OSIRIS przewidywał dodatkowo działanie karcynogenne oraz teratogenne.

W drugim etapie pracy, w celu zweryfikowania danych wynikających z symulacji metodą *in silico,* Doktorantka przeprowadziła badania aktywności mutagennej tych samych związków metodami *in vitro.* Zastosowała dwa różne modele badawcze: test Amesa oraz test *Vibrio harveyi.* Interpretację uzyskanych wyników Autorka przeprowadziła w oparciu o analizę statystyczną oraz analizę wartości współczynnika mutagenności MI. Żadna z badanych substancji nie wykazała aktywności mutagennej (wartości MI <2). Natomiast analiza statystyczna zależności między liczbą kolonii rewertantów *his** w stosunku do rozpuszczalnika dla jedenastu związków dała wartości znamiennie wyższe, co sugerowało aktywność mutagenną. Niemniej nie stwierdzono dla tych związków zależności typu stężenie-aktywność mutagenna, będącego potwierdzeniem takiego działania. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że efekty symulacji metodą *in silico* nie całkowicie są zgodne z wynikami badań *in vitro.* Cztery wytypowane jako mutagenne związki nie wykazały takich własności w testach *in vitro.*

Istotnym osiągnięciem Autorki rozprawy była ocena przydatności mikrobiologicznego testu *Vibrio harveyi* do skriningowych testów aktywności mutagennej oraz opracowanie wersji mikropłytkowej tego testu, znacznie ograniczającego objętości wykorzystywanych mediów hodowlanych, odczynników oraz testowanych związków, szybkiego i umożliwiającego jednoczesne testowanie wielu substancji.

W trzecim etapie badań p. mgr Beata Powroźnik przeprowadziła ocenę aktywności antymutagennej wybranych związków, dla których w teście Amesa analiza statystyczna nie wykazała potencjału mutagennego. Do badań wykorzystała zmodyfikowane wersje testu

Amesa oraz testu *Vibrio harveyi.* Na podstawie wyników uzyskanych w obu testach Doktorantka wyselekcjonowała trzy struktury, których aktywność antymutagenną oceniła jako wysoką: izomery R oraz S [2-[2-(2,6-dimetylofenoksy)etoksy]etyloamino]propan-1-olu (preparaty 1 i 2) oraz N-[3-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazyn-1-ylo]propylo]-7-chinolinosulfonamid (związek 33).

Reasumując, warte podkreślenia są zalety, zarówno poznawcze jak i aplikacyjne recenzowanej pracy:

1. Opracowany został mikropłytkowy test *Vibrio harveyi* oraz przeprowadzona została ocena jego przydatności do skriningowej oceny mutagenności badanych substancji.
2. Przeprowadzone zostało porównanie wyników osiąganych przy zastosowaniu różnych modeli badawczych. W znaczącej części przypadków wyniki uzyskane z symulacji komputerowej i badań in vitro były zbieżne. Można więc wyciągnąć wniosek, że metoda *in silico* jest przydatnym lecz nie idealnym narzędziem w przewidywaniu mutagenności syntezowanych związków.
3. Wykorzystując proste modyfikacje testów Amesa i *Vibrio harveyi* przeprowadzone zostało badanie antymutagenności większości spośród badanych substancji, dostarczając dodatkowych danych na temat ich aktywności biologicznej.
4. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania mutagenności i antymutagenności nowych, aktywnych biologicznie związków dostarczyły danych przydatnych dla ewentualnego przeprojektowania cząsteczek, przyczyniły się również do selekcji potencjalnych leków do dalszych badań przedklinicznych.

Jako recenzent zobowiązana jestem do wskazania ewentualnych technicznych niedociągnięć i wątpliwości powstających w czasie lektury ocenianej rozprawy. Tego typu krytyczne uwagi w przypadku recenzowanej rozprawy są nieliczne.

- Moim zdaniem trudno jest twierdzić, że badaniom poddano 36 nowych związków, jeżeli niektóre z 36 badanych substancji (np. substancje 1,2 i 3; 4,5 i 6; 7, 8 i 9) stanowią dwa enancjomery tego samego związku oraz mieszaninę racemiczną.

-W zapisie nazw chemicznych związków wykazujących działanie antymutagenne (strona 109) popełnione są drobne błędy.

Są to jednak niewielkie błędy formalne, w żaden sposób nie pomniejszające wartości przedstawionej do recenzji pracy.

Natomiast problemem, który warto byłoby przedyskutować jest wyższa wartość mutagenności w teście Amesa mieszaniny racemicznej (9) od każdego z enencjomerów R i S (związki 7 i 8 , Tabela 15).

Z kolei mieszanina racemiczna (3) izomerów R (1) i S (2) ma znacznie niższą antymutagenność od każdego z izomerów wchodzących w jej skład (Tabela 19). Interesujące jest, czy są to różnice istotne statystycznie? Jeżeli tak, warto by zastanowić się nad możliwym wyjaśnieniem tych interesujących faktów.

Recenzowana dysertacja ma postać 132 stronicowej rozprawy o klasycznym układzie, zawierającej streszczenie w języku polskim i angielskim, część teoretyczną (wstęp), założenia i cel pracy, opis stosowanej metodyki (materiały i metody), opis badań własnych, dyskusję wyników i wnioski oraz podsumowanie. Praca napisana jest w sposób precyzyjny; zarówno w części teoretycznej, jak i opisie badań własnych i dyskusji wyników cechuje się jasnym skondensowanym opisem. Pod względem graficznym przygotowana jest bardzo starannie.

Podsumowując stwierdzam, że mgr Beata Powroźnik przedłożyła wartościową pracę, wnoszącą wkład do wiedzy na temat alternatywnych metod badania mutagenności i antymutagenności potencjalnych leków. Doktorantka wykazała się zdolnością zaprojektowania i przeprowadzenia złożonych eksperymentów, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. W mojej ocenie recenzowana rozprawa odpowiada w pełni wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego - Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pani mgr Beaty Powroźnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa 11 lipca 2016

Jadwiga Turło

dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (22) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl