WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Katedra i Zakład Technologii Leków
i Biotechnologii Farmaceutycznej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Marć,
p.t. „Ocena profilu farmaceutycznego wybranych związków selenoorganicznych i pochodnych hydantoiny o potencjalnym zastosowaniu w terapii nowotworów",
wykonanej w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych
Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Collegium Medicum
Promotor dr hab. inż. Jadwiga Handzlik, prof. UJ
Promotor pomocniczy dr Gniewomir Latacz

Tematyka badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej pani mgr Małgorzaty Marć związana była z poszukiwaniem nowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych - związków, które wykazywałyby bezpośrednie działanie na komórki nowotworu i równocześnie spełniałyby dodatkowe istotne warunki: byłyby oporne na mechanizmy MDR (wielolekooporności) i miały zarazem korzystny profil ADMET.

Bezpośrednim celem pracy było przeprowadzenie rozszerzonego skriningu biologicznego dla 25 związków: 19 związków pochodnych selenu (selenoestry i selenobezwodnik) oraz 6 pochodnych hydantoiny, oraz ocena na podstawie uzyskanych wyników, czy badane związki powinny przejść do dalszych etapów badań przedklinicznych. Wspólną cechą związków o zróżnicowanej strukturze była wysoka aktywność we wstępnym skriningu biologicznym, w tym silne i selektywne działanie cytotoksyczne oraz proapoptotyczne. Niektóre z nich miały zdolność odwracania mechanizmów wielolekooporności.

Tematykę badań podjętą przez Doktorantkę należy ocenić jako bardzo aktualną. Wobec dramatycznych prognoz dotyczących epidemiologii nowotworów i narastającego problemu wielolekooporności, limitującej skuteczność aktualnie stosowanych leków, często

cechujących się niekorzystnymi właściwościach ADME, poszukiwanie nowych środków jest niezwykle istotne.

Bardzo interesujące są podjęte przez Doktorantkę rozszerzone badania aktywności biologicznej oraz ADMET grupy organicznych związków selenu. Od dość dawna wiadomo, że wiele związków selenu – organicznych i nieorganicznych – wykazuje silne, zależne od typu związku działanie biologiczne, w tym przeciwnowotworowe. Może ono być efektem ich cytotoksyczności, działania chemoprewencyjnego, immunomomodulacyjnego, indukcji apoptozy i innych. Istnieją jednak poważne kontrowersje dotyczące np. wąskiego indeksu terapeutycznego tych związków, ich toksyczności i trwałości, a wiedza o parametrach ADMET tych związków jest niewielka.

Recenzowana dysertacja ma postać 241 stronicowej rozprawy w języku angielskim o klasycznym układzie, zawierającej streszczenie w języku angielskim i polskim, część teoretyczną (wstęp), założenia i cel pracy, opis stosowanej metodyki (materiały i metody), opis badań własnych, dyskusję wyników i wnioski, oraz podsumowanie. Praca zaopatrzona jest w materiały uzupełniające: 8 tabel i 3 ryciny. Zaprezentowany w dysertacji przegląd piśmiennictwa jest szeroki; obejmuje 302 pozycje, w wysokim procencie opublikowanych w okresie ostatnich 5 lat. Stanowi on czytelną podstawę dla postawionej przez doktorantkę hipotezy badawczej.

We wstępie, stanowiącym część teoretyczną rozprawy Autorka skupiła się na czterech głównych zagadnieniach ściśle związanych z wyborem tematyki badań:

- epidemiologii nowotworów i stosowanych aktualnie metod leczenia, z uwzględnieniem problemu wielolekooporności,
- własnościach farmakologicznych związków selenu ze szczególnym uwzględnieniem aktywności przeciwnowotworowej,
- aktywności przeciwnowotworowej pochodnych hydantoiny, i wreszcie
- roli wielokierunkowych badań profilu ADMET w poszukiwaniu nowych leków.

Cytowane we wstępie dysertacji dane dotyczące wspomnianej powyżej tematyki stanowiły dla Doktorantki przesłankę do podjęcia rozszerzonych badań biologicznych zróżnicowanych pod względem struktury związków o potwierdzonej we wstępnych badaniach aktywności cytotoksycznej.

Badania własne przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Małgorzaty Marć były niezwykle szerokie i dobrze zaplanowane. Biorąc pod uwagę cel i stosowaną metodykę można je podzielić na trzy kolejne etapy

- Pierwszy, najszerszy z etapów badań dotyczył wielokierunkowego oznaczenia aktywności biologicznej badanych związków.

  - Pierwsza część tych badań polegała na testach cytotoksyczności wobec linii ludzkich komórek nowotworowych *neuroblastoma* i *astrocytoma*. Badania prowadzone z wykorzystaniem testów MTT i MTS stanowiły uzupełnienie i rozszerzenie wcześniej przeprowadzonych badań cytotoksyczności i dotyczyły nowotworów układu nerwowego z trudem podlegających chemioterapii.

  Interesujące jest, że najaktywniejsze w tych testach okazały się związki pochodne selenu, selenoestry i selenobezwodnik.

  - Następnie Doktorantka przeprowadziła badania działania pro/antyoksydacyjnego testowanych związków, stosując metodę DPPH oraz DCFH-DA. Były w pełni uzasadnione, jako że działanie przeciwnowotworowe i chemoprewencyjne wielu związków, np. pochodnych selenu, korelowane jest właśnie z aktywnością prooksydacyjną lub antyoksydacyjną.

  - W następnym etapie pani magister Marć przeprowadziła badania nad synergizmem działania testowanych związków z doksorubicyną. Również w tym przypadku organiczne związki selenu wykazały najwyższą aktywność.

  - Doktorantka badała też zdolność inhibicji przez podlegające testom związki pomp lekooporności związanej z nadekspresją glikoproteiny P (P-gp). Podobne badania były wcześniej prowadzone dla pochodnych hydantoiny i wykazały silną inhibicję pompy oporności wielolekowej P-gp1. Testowane w trakcie badań związki selenu wykazały również aktywność, niemniej znacząco niższą od pochodnych hydantoiny.

- W drugim etapie badań Doktorantka przeprowadziła oznaczenie własności fizykochemicznej oraz skrining profilu ADME testowanych związków z wykorzystaniem rozlicznych metod *in vitro* i *in silico*. Ich celem było oszacowanie stabilności metabolicznej badanych związków i określenie ścieżki biotransformacyjnej. Badania *in silico* prowadzone były z wykorzystaniem trzech programów komputerowych (Chemicalize, SwissADME, Molinspiration) natomiast *in vitro* m. in. testem przepuszczalności PAMPA, w modelu *Cunninghamella i testem z* wykorzystaniem ludzkich mikrosomów.

- Trzeci etap polegał na przeprowadzeniu testów bezpieczeństwa: *in silico* (program OSIRIS) oraz *in vitro* poprzez test AMES oraz w modelu *V. harveyi.*

Zastosowane przez Doktorantkę w 2) i 3) etapie badań zarówno testów *in silico* jak i różnych typów testów *in vitro* dla określenia własności testowanych związków było bardzo cenne z punktu widzenia metodycznego. Pozwoliło na porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami i zapewniło wysoką wiarygodność uzyskanych danych.

Uzyskane wyniki są interesujące: wskazują na wyższą aktywność przeciwnowotworową selenoestrów i selenobezwodnika od pochodnych hydantoiny, przy równoczesnym mniej korzystnym ich profilu ADMET. Związki te wyraźnie wykazywały niższą trwałość w warunkach testów. Równocześnie z danych literaturowych wynika, że niektóre produkty degradacji związków selenu wykazują wysoką aktywność przeciwnowotworową. Niska trwałość, przy niskiej toksyczności w tej sytuacji nie jest wadą potencjalnego leku. Testowane związki selenu wykazywały również synergizm działania z doksorubicyną.

Związki hydantoinowe z kolei, wykazywały większą trwałość i korzystniejszy profil ADMET przy niższej aktywności przeciwnowotworowej. Bardzo istotną cechą tych związków była też mocna inhibicja pomp lekooporności.

Reasumując, Doktorantka udowodniła, że większość badanych związków, jako obiecujące struktury, powinny przejść do dalszych etapów badań przedklinicznych.

Warte podsumowania są zalety, zarówno poznawcze jak i aplikacyjne recenzowanej pracy:

1. Przeprowadzone przez Doktorantkę rozszerzone badania serii aktywnych biologicznie związków - potencjalnych leków - pozwoliły zidentyfikować struktury najlepiej rokujące jako potencjalne leki przeciwnowotworowe.
2. Udowodnione zostały korzystne właściwości ADMET dla badanych przedstawicieli zarówno związków selenu jak i pochodnych hydantoiny.
3. Znacząco rozszerzona została wiedza na temat aktywności, metabolizmu i mechanizmu działania przeciwnowotworowego interesującej grupy organicznych związków selenu.
4. Wykazana została możliwość stosowania niektórych z badanych związków w terapii skojarzonej z innymi chemioterapeutykami
5. Dla niektórych spośród badanych związków wykazano wysoką zdolność inhibicji pomp lekooporności.

Zagadnienia wymagające dodatkowego wyjaśnienia przez Doktorantkę w mojej opinii są nieliczne i mają raczej charakter pytań niż zastrzeżeń. Interesujące byłoby przeprowadzenie szerszej analizy zależności aktywność– budowa chemiczna dla związków obydwu grup chemicznych. Może warto byłoby się pokusić o zaplanowanie optymalnej cząsteczki, łączącej najlepsze własności testowanych związków?

Podsumowując pragnę stwierdzić, że mgr Małgorzata Marć przedłożyła bardzo wartościową pracę, wnoszącą poważny wkład do wiedzy na temat aktywności i parametrów farmakokinetycznych niezwykle interesujących i aktywnych potencjalnych leków przeciwnowotworowych oraz dotyczącą możliwości stosowania tych związków w terapii skojarzonej. Doktorantka wykazała się umiejętnością tworzenia hipotezy badawczej, zaprojektowania i przeprowadzenia złożonych eksperymentów, analizy otrzymanych wyników oraz formułowania wniosków. W mojej ocenie recenzowana rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie pani mgr Małgorzaty Marć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres i wysoki poziom recenzowanej pracy, jej walory aplikacyjne oraz doceniając znaczący dorobek publikacyjny Doktorantki (jest ona współautorką oraz pierwszą autorką publikacji o sumarycznym współczynniku oddziaływania ponad 20), składam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Warszawa 03 marca 2019

Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
tel. (22) 57 20 647, 57 20 638
faks (2) 57 20 631
e-mail: tsl@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl