UNIWERSYTET MEDYCZNY w LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
u. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel.: 48(81) 448-72-40
e-mail: monika.pitucha@umlub.pl

Prof. dr hab. Monika Pitucha
Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedry i Zakładu Chemii Organicznej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Annamarii Lubelskiej

p.t.” *Ocena parametrów ADMET wybranych ligandów receptorów serotoninowych z grupy pochodnych hydantoiny i 1,3,5-triazyny*”

przygotowanej w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych
pod kierunkiem:
Promotor – prof. dr hab. inż. Jadwigi Handzlik
Promotora pomocniczego - dr hab. Gniewomira Latacza

Ocena rozprawy doktorskiej została przygotowana w związku z pismem z dnia 31 maja 2023r. odnośnie powierzenia mi przez Radę Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie funkcji recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Annamarii Lubelskiej wszczętym w dniu 24 kwietnia 2017r.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia bardzo wartościowe wyniki badań realizowane w interdyscyplinarnych zespołach badawczych w ramach projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych. Jest to kontynuacja badań prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych obejmujących projektowanie oraz syntezę nowych związków chemicznych działających na receptory 5-HT_6R.

Struktura rozprawy doktorskiej

Dysertacja mgr Annamarii Lubelskiej obejmuje 194 strony maszynopisu zawierającego 58 rysunków, 12 wykresów, 19 tabel oraz 137 pozycji literaturowych. Układ pracy ma formę klasycznej rozprawy i jest typowy dla tego typu opracowań. Rozpoczyna się streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem skrótów. Kolejne rozdziały to wprowadzenie, cel i zakres pracy, opis badań własnych, dyskusja, podsumowanie, część doświadczalna oraz aneks. Do pracy dołączona jest lista publikacji współautorstwa Doktorantki, udział w projektach badawczych oraz aktywność Doktorantki na konferencjach naukowych. Szkoda, że zamieszczone informacje nie zawierają danych bibliometrycznych.

Cześć literaturowa obejmująca 36 stron maszynopisu podzielona jest na 6 podrozdziałów stanowiących wprowadzenie do badań naukowych prowadzonych przez Doktorantkę. W pierwszym podrozdziale Autorka skoncentrowała się na charakterystyce serotoniny, jej roli w organizmie oraz wpływie nieprawidłowości neuroprzekaźnictwa serotoninergicznego na choroby i dysfunkcje psychoneurologiczne. Kolejne części to opis receptora 5-HT_6 i 5-HT_7 jako celu terapeutycznego w leczeniu schorzeń OUN. Po wyczerpującej charakterystyce wzbogaconej o rysunki biochemicznego mechanizmu funkcji omawianych receptorów Doktorantka omawia stan wiedzy na temat poszukiwania ligandów receptora $5HT_6$ i $5HT_7$ oraz trudności z tym związane. W tej części mgr Annamaria Lubelska wyrysowała struktury badanych aktualnie ligandów oraz scharakteryzowała substancje znajdujące się w fazie badań klinicznych. Dalej Doktorantka umiejętnie przeszła do badań prowadzonych w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, które obejmują projektowanie, syntezę oraz badanie możliwości terapeutycznych ligandów z grupy pochodnych triazyny i hydantoiny. Na koniec tego podrozdziału Doktoranta opisuje znaczenie skriningu ADMET w badaniach nad lekiem jako wprowadzenie do badań własnych. Całość napisana jest przejrzyście i obejmuje zagadnienia ściśle odnoszące się do tematu pracy. Mgr Annamaria Lubelska dokonała szerokiej analizy obszaru badawczego z poprawnie dobrną i zacytowaną literaturą (103 pozycje). Całość stanowi bardzo dobre wprowadzenie w podjętą tematykę badawczą.

Rozdział drugi to **cel i zakres pracy** wynikający z potrzeby otrzymywania bezpiecznych i efektywnych leków o korzystnej aktywności i profilu farmaceutycznym.

Kolejny rozdział **Wyniki badań własnych** podzielony jest na dwa podrozdziały: symulacja paramentów ADMET *in silico* oraz eksperymentalny skrining ADMET. Jest to obszerny opis wyników z wykorzystaniem różnych modeli dla 1,3,5-triazynowych ligandów receptora 5-HT_6 oraz hydantoinowych ligandów receptora 5-HT_7 a także ocena parametrów ADMET *in vitro* w obu grupach związków.

W rozdziale czwartym **Dyskusja** Doktorantka dokonuje analizy porównawczej profilu ADMET triazynowych ligandów receptora 5-HT_6R z hydantoinowymi ligandami receptora 5-HT_7R. W świetle tej analizy obie grupy związków zostały ocenione pod względem parametrów farmakokinetycznych, stabilności metabolicznej oraz wyników bezpieczeństwa *in vitro*.

Rozdział piąty to **Podsumowanie** osiągniętych rezultatów. W tej części mgr Annamaria Lubelska dokonuje zestawienia prowadzonych badań naukowych podając źródła finasowania. Należy podkreślić, że badania zostały częściowo finansowane w ramach projektów NCN oraz działalności statutowej Pani Promotor.

Kolejny rozdział to **Część eksperymentalna**, w której Doktorantka podaje nazwy i pochodzenie badanych związków oraz metodykę dotyczącą symulacji parametrów ADMET i badania stabilności metabolicznej metodą *in silico*. Szczegółowo charakteryzuje sposoby badania parametrów ADMET *in vitro* opisując procedury wykonania poszczególnych testów, analizy danych. Jest to obszerne 30 stronnicowe opracowanie wzbogacone licznymi rysunkami, wzorami oraz zdjęciami. Całość świadczy o dobrym opanowaniu przez Doktorantkę metodyki prowadzonych w ramach doktoratu badań naukowych. Na uwagę zasługuje ilość wykonanych testów świadczących o dużym zaangażowaniu Autorki w realizację zaplanowanego celu pracy.

Ostatnim rozdziałem jest **Literatura** obejmująca 137 aktualnych pozycji głównie anglojęzycznych. Do pracy dołączony jest Aneks zawierający wyniki badań uzyskane przy użyciu MetaSite 6.0.1. oraz widma analizy fragmentacyjnej MS/MS.

Zaproponowany przez Autorkę układ dysertacji nie budzi zastrzeżeń a kolejność rozdziałów jest logiczną konsekwencją realizowanego tematu badań. **Z całym przekonaniem można stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Annamarii Lubelskiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki farmaceutyczne a Doktorantka posiada przygotowanie do prowadzenia pracy naukowej.**

Uzasadnienie wyboru tematu rozprawy doktorskiej

Temat niezwykle ważny i interesujący bo podejmuje istotne zagadnienia dotyczące zdrowia i jakości życia pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne. Neuroprzekaźnictwo serotoninergiczne jest kluczowe w funkcjach kognitywnych. Wpływa na nastrój, pamięć, zachowanie, cykl dobowy, apetyt, regulację termiczną. Nieprawidłowości neuroprzekaźnictwa serotoninergicznego są ściśle związane z ważnymi chorobami i dysfunkcjami psychoneurologicznymi. Układ serotoninergiczny reguluje wiele funkcji fizjologicznych organizmu, takich jak krążenie krwi, praca serca, stany emocjonalne, sen, pamięć, ból, pobieranie pokarmu oraz zachowania seksualne. Serotonina jest również zaangażowana w powstawanie procesów patologicznych leżących u podłoża chorób psychicznych, m.in.: lęku, depresji, zaburzeń łaknienia i snu oraz schizofrenii. Receptory serotoninowe charakteryzują się dużym zróżnicowaniem oraz licznymi powiązaniami z innymi układami neuroprzekaźnikowymi. Obecnie za bardzo obiecujący cel badawczy uważa się receptor 5-HT_7, ponieważ może być zaangażowany w etiologię chorób psychicznych i działanie leków przeciwdepresyjnych. Pogląd ten oparty jest m.in. na zaobserwowanej dużej gęstości receptorów 5-HT_7 w strukturach limbicznych ośrodkowego układu nerwowego (OUN), co może świadczyć o ich roli w procesach emocjonalnych. Z kolei, receptory 5-HT_6 zlokalizowane są w ośrodkowym układzie nerwowym i stanowią istotną część układu receptorów serotoninowych. Inhibicja receptorów 5-HT_6 prowadzi do zwiększenia przekaźnictwa w układzie cholinergicznym i glutaminergicznym,

a modulacja działania tych receptorów może mieć szczególne znaczenie dla chorych cierpiących na różnego rodzaju otępienia i demencje z współwystępującymi tzw. objawami behawioralnymi i psychologicznymi. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą szeregu związków mających poprawić funkcje poznawcze w chorobie Alzheimera oraz schizofrenii zaliczanych do chorób cywilizacyjnych, które są ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny. W tym kontekście wybór tematu należy uznać za trafny i w pełni uzasadniony.

Problem badawczy i jego rozwiązanie

Odkrycie i badania nowego leku to koszt rzędu miliardów dolarów niegwarantujący powodzenia. Pomimo szeroko zakrojonych badań, jak dotąd żaden selektywny ligand receptora 5-HT_6R i 5-HT_7 nie dotarł na rynek farmaceutyczny. Głównymi przyczynami tych niepowodzeń są działania niepożądane oraz brak oczekiwanej odpowiedzi przez organizm, wbrew obiecującej aktywności w testach przedklinicznych. W ostatnich latach obserwujemy dynamiczny rozwój narzędzi obliczeniowych mających ograniczyć koszty i zminimalizować ryzyko pominięcia w badaniach przesiewowych (na różnych etapach odkrywania i rozwoju leków) odpowiednich kandydatów na lek. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badań doskonale wpisuje się w nurt tych poszukiwań. Taki też był cel pracy doktorskiej - **wstępne oszacowanie narzędziami bioinformatycznymi najważniejszych parametrów ADMET dla dziesięciu ligandów 5-HT_6R oraz siedmiu ligandów 5-HT_7R, by następnie metodami *in vitro* przeprowadzić ocenę „zdolności bycia lekiem" dla wytypowanych siedemnastu związków w grupie pochodnych hydantoiny i 1,3,5-triazyny.** Cel ten Doktoranta zrealizowała poprzez skrening ADMET obejmujący 1) symulację parametrów ADMET *in silico*, z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz 2) ocenę parametrów ADMET *in vitro*. Badania *in vitro* obejmowały: badanie przenikalności przez błony biologiczne i stabilności metabolicznej, ocenę interakcji lek-lek związaną z działaniem związków na aktywność wybranych izoform cytochromu P450 oraz wstępną ocenę cytotoksyczności, hepatotoksyczności i mutagenności. Dla pochodnych 1,3,5-triazyny wykonano badanie powinowactwa do glikoproteiny P (Pgp) oraz wyznaczono stopnień wiązania związków z białkami osocza. Ocenie parametrów ADMET zostały poddane wysoce aktywne związki reprezentujące dwie oddzielne kategorie ligandów receptorów serotoninowych. Kryterium wyboru związków do testów były ich powinowactwo i selektywność do głównego celu białkowego (receptorów 5-HT_6 lub 5-HT_7) stwierdzone uprzednio w testach radioreceptorowych i funkcjonalnych. Uwagę zwraca imponująca ilość wykonanych testów i zaangażowanie Autorki w ich wykonanie.

Doktorantka dokonała analizy porównawczej profilu ADMET dziesięciu triazynowych ligandów receptora 5-HT6R z siedmioma hydantoinowymi ligandami receptora 5-HT7R. Przeprowadzone badania profilu ADMET *in vitro* wsparte wstępnymi badaniami *in silico* wykazały, że obie grupy połączeń cechuje zadowalające bezpieczeństwo, a ryzyko działań toksycznych pojawia się przy stężeniach znacznie przewyższających wartości stałych powinowactwa

receptorowego. Obie serie charakteryzuje również satysfakcjonujący profil ADME *in vitro*, który bardziej korzystnie wypadł dla 1,3,5-triazynowych ligandów receptora 5-HT_6. Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane i zilustrowane licznymi rysunkami, tabelami i wykresami. Na podstawie uzyskanych danych Autorka wyłoniła struktury wiodące do dalszych modyfikacji oraz szerszego skriningu biologicznego w poszukiwaniu innowacyjnego leku OUN.

W tej części zabrakło wniosków. Czy podczas obrony doktoratu Doktorantka mogłaby sformułować 3-4 wnioski wynikające z przeprowadzonych badań?

Rozprawa doktorska mgr Annamarii Lubelskiej jest kompleksowym opracowaniem, którego niewątpliwym osiągnięciem jest wykazanie, że właściwe przeprowadzenie, interpretacja i wykorzystanie wyników testów ADME jest kluczowym zagadnieniem w badaniach i rozwoju leku i staje się priorytetem w selekcji kandydatów do badań klinicznych.

Praca napisana jest starannie i trudno w niej doszukać się większych błędów natury edycyjnej.

Poniżej kilka drobnych uwag redakcyjnych, które nie mają wpływu na ogląd pracy:

1. chlorobenzylo – brakuje informacji w jakiej pozycji znajduje się chlor (strona 66)
2. „*w ugrupowaniu 2-etoksyfenylowy w pozycji meta i para*" – należałoby ujednolicić nomenklaturę
3. Cześć eksperymentalna - badane związki (strona 126-127) „ethoksyfenylo", „3-chlorobenzyli" literówki oraz zbędne spacje

Mimo drobnych pomyłek edytorskich z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że mgr Annamaria Lubelska posiada dobre przygotowanie merytoryczne do prowadzonych badań oraz potrafi posługiwać się zaawansowanymi technikami badawczymi i ciągle doskonali swój warsztat badawczy.

Przy lekturze rozprawy doktorskiej mgr Annamarii Lubelskiej nasuwają się też pewne uwagi i pytania:

1. Wśród pochodnych hydantoiny znajduje się związek z grupą cyjankową (KKB-36). Czy w swoich badaniach wzięła Pani uwagę fakt, że grupa ta ulega ławo hydrolizie?
2. Badane przez Panią Doktorantkę związki różniły się jednak strukturalnie. Czy mogłaby Pani wskazać elementy struktury, które są Pani zadaniem istotne z punktu widzenia idealnych ligandów dla badanych receptorów?
3. Pisząc o wpływie dysfunkcji układu serotoninowego wspomniała Pani o zaburzeniach obsesyjno-kompulsywnych. Czy w tym temacie prowadzone są jakieś badania? Jak wygląda farmakoterapia tych zaburzeń?

M. Rol

W **podsumowaniu** stwierdzam, że rozprawa doktorska autorstwa mgr Annamarii Lubelskiej prezentuje wysoki poziom merytoryczny i stanowi przykład badań empirycznych opartych na solidnych podstawach teoretycznych realizowanych z wykorzystaniem przejrzyście opisanej metodologii. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą z zakresu nauk farmaceutycznych niezbędną do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętnością wykorzystania nowoczesnych technik badawczych i twórczej analizy otrzymanych wyników.

Rozprawa doktorska mgr Annamarii Lubelskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie rozprawy mgr Annamarii Lubelskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

Lublin, 14.07.2023r.

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Monika Pitucha