



Lublin, 27.04.2020r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Michała Józwiaka

p.t., „Synteza i badania aktywności biologicznej nowych heterocyklicznych pochodnych kwasów tłuszczowych o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i cytotoksycznym”

wykonanej w Zakładzie Biochemii i Farmakogenomiki Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej
Wydział Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem prof. dr hab. Marty Stuga jako promotora

Recenzja została przygotowana na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 11 marca 2020r. i przedłożona zgodnie z pismem Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Pana dr hab. n.farm. Marcina Sobczaka z dnia 12 marca 2020r. (URN//FARM/5910/696-02/20).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Michała Józwiaka stanowi monotematyczny cykl trzech prac opublikowanych w specjalistycznych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania IF. Całość opatrzona jest autoreferatem podzielonym na cel pracy, wstęp, opis prowadzonych badań, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. Do autoreferatu dołączone są wydruki publikacji wchodzące w skład cyklu będącego postawą ubiegania się o stopień doktora, oświadczenia współautorów, wykaz dorobku naukowego oraz życiorys. Całość napisana jest w sposób zwięzły i czytelny. Niniejsze opracowanie zostało napisane przejrzysto i odpowiada ogólnie przyjętym normom. Brakuje jednak streszczenia w j. polskim i angielskim.

Nadrzędnym celem niniejszej pracy doktorskiej była synteza nowych pochodnych kwasów tłuszczowych (nasyconych oraz nienasyconych) o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz antyproliferacyjnej. Cel ten realizowany był wieloetapowo poprzez syntezę oraz badania biologiczne uzyskanych połączeń. Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone przy pomocy nowoczesnych technik spektroskopowych. Zbadano aktywność przeciwdrobnoustrojową otrzymanych związków na standardowych i klinicznych szczepach bakterii oraz na wybranych szczepach grzybów, oznaczono cytotoksyczności, migrację komórek oraz wykonano analizę cytometryczną mechanizmów apoptozy. Obrany cel pracy jest w pełni uzasadniony.

Rozwój oporności drobnoustrojów na stosowane aktualnie antybiotyki jest procesem bardzo dynamicznym i szybszym niż synteza nowych, skutecznych leków. Mechanizmy powstawania oporności drobnoustrojów są bardzo złożone i niekiedy nie do końca poznane. Istnieje kilka lub

kilkanaście powodów tak szybkiego rozprzestrzeniania się lekooporności wśród drobnoustrojów. Najczęściej podaje się nieuzasadnione lub zbyt krótkie zażywanie antybiotyków, nadużywanie antybiotyków w hodowli zwierząt, sadownictwie i wielu gałęziach przemysłu. Choroby wywołane przez drobnoustroje, pomimo znanej etiologii i opracowanych procedur leczenia, z roku na rok stanowią coraz większe zagrożenie zdrowotne dla światowej populacji. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) stajemy przed groźbą, że za 20-40 lat będziemy bezradni wobec grypy, rzeżączki, gruźlicy i innych groźnych chorób. Bez skutecznych antybiotyków wiele zabiegów, operacji oraz chemioterapia będą niemożliwe. Stanowi to poważne zagrożenie dla pacjentów onkologicznych, których przybywa w zastraszającym tempie zarówno w Polsce jak i na świecie.

Według Światowej Organizacji Zdrowia nowotwory złośliwe są najczęstszą przyczyną zgonów na całym świecie. Leczenie chorób nowotworowych jest jednym z najtrudniejszych problemów medycyny. Patogeneza wielu nowotworów nie jest do końca poznana, a zróżnicowanie komórek nowotworowych w stosunku do komórek zdrowych jest zbyt małe. Wśród aktualnie dostępnych leków większość to chemioterapeutyki o wysokiej aktywności cytotoksycznej, ale o licznych działaniach niepożądanych i ograniczonej selektywności działania. Bez nowych leków nie poradzimy sobie z wieloma chorobami, które na obecną chwilę wydają się pokonane. Dlatego bardzo ważne jest intensywne poszukiwanie nowych, skutecznych związków, które mogą znaleźć zastosowanie jako substancje czynne produktów leczniczych.

We wstępie przedstawionego do oceny opracowania Doktorant uzasadnił podjęcie celu badań własnych. Scharakteryzował kwasy tłuszczowe, ich znaczenie biologiczne i farmakologiczne. Podkreślił znaczenie zmodyfikowanych kwasów tłuszczowych jako związków o aktywności przeciwnowotworowej. Scharakteryzował związki heterocykliczne jako znaczące elementy układów biologicznych. Szczególną uwagę Doktorant poświęcił kumarynom i ich modyfikacjom. Przegląd piśmiennictwa na temat właściwości biologicznych kwasów tłuszczowych i modyfikacji posłużył do przygotowania pracy przeglądowej pt. *“Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives”*, która wchodzi w skład monotematycznego cyklu publikacji przedstawionego do oceny. Praca została opublikowana w renomowanym czasopiśmie posiadającym 100 punktów MNiSW oraz IF równym 3.170. Z oświadczeń współautorów wynika, że Doktorant miał wiodący wkład (70%) w przygotowanie pracy. Udział p. Michała Józwiaka polegał na zebraniu aktualnego piśmiennictwa oraz redakcji manuskryptu. Jest to szczególne osiągnięcie, gdyż artykuły przeglądowe zazwyczaj wymagają wieloletniego doświadczenia autora. Świadczy to dobrym przygotowaniem Doktoranta do pracy naukowej i umiejętności analizy światowej literatury.

W pierwszym etapie badań eksperymentalnych Doktorant zaproponował syntezę nowych połączeń kwasów tłuszczowych z wykorzystaniem pochodnych tiosemikarbazydu, 1,2,4-triazolu oraz 1,3,4-tiadiazolu, a otrzymane związki scharakteryzował przy pomocy nowoczesnych technik spektroskopowych. Wykorzystanie kwasów tłuszczowych do otrzymania nowych hybrydowych

połączeń ze związkami heterocyklicznymi jest bardzo ciekawym pomysłem i może skutkować wzrostem aktywności biologicznej oraz poprawą parametrów terapeutycznych cząsteczki. Następnie nowo otrzymane związki zostały poddane badaniom biologicznym w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz antyproliferacyjnej. Spośród badanych związków najbardziej obiecujące okazały się pochodne tiosemikarbazydu, których wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) wobec *Candida albicans* mieściły się w zakresie 1,56-6,25 µg/mL. Co ciekawe analogiczne wartości uzyskano dla *C. albicans* izolatu 26 oraz *C. albicans* izolatu 18. Związki nie wykazywały właściwości cytotoksycznych ($IC_{50} > 100$). Cennym uzupełnieniem badań była analiza 19 deskryptorów molekularnych. Udowodniono, że aktywność biologiczna była ściśle powiązana z obecnością halogenowego podstawnika w pozycji 3 pierścienia aromatycznego i preferowana jest obecność chloru. Z zamieszczonych oświadczeń Autora i współautorów wynika, że mgr M. Józwiak brał czynny udział w wykonywaniu badań biologicznych. To cenna umiejętność, która świadczy o kompleksowym podejściu Doktoranta do badań naukowych.

Kolejna część badań mgr. M. Józwiaka koncentrowała na syntezie nowych estrowych pochodnych alloxantoksyletyny. Doktorant otrzymał i scharakteryzował 11 nowych estrów alloxantoksyletyny wykorzystując w tym celu kwasu tłuszczowe o różnej długości łańcucha oraz różnym stopniu nasycenia. Badania biologiczne *in vitro* otrzymanych związków wykazały aktywność cytotoksyczną wobec linii nowotworowej komórek czerniaka HTB-140 (IC_{50} 14,4-35,4 µM). Przy czym rosnący poziom nienasycenia łańcucha węglowodorowego powodował wzrost aktywności związku. Zauważono również silniejszy efekt cytotoksyczny wobec linii komórek nowotworowych niż wobec linii prawidłowej (HaCaT). Cytotoksyczność, jak również hamowanie migracji były proporcjonalnie do stężenia badanych związków. Co dobrze rokuje na przyszłość. Badane pochodne w większym stopniu indukowały wczesną apoptozę komórek HTB-140 w porównaniu do A549 i HaCaT. Ponadto, badania wykazały, że stosowanie pochodnych alloxantoksyloksyny zmniejszało uwalnianie interleukiny-6, która pełni ważną rolę w patogenezie i rozwoju chorób nowotworowych. Jest to niezwykle ważna informacja szczególnie w kontekście poszukiwania nowych celów molekularnych.

Uzyskane wyniki badań eksperymentalnych p. Michał Józwiak opisał w dwóch pracach oryginalnych („*Synthesis, Structural Studies and Biological Evaluation of Connections of Thiosemicarbazide, 1,2,4-Triazole and 1,3,4-Thiadiazole with Palmitic Acid*” oraz „*Anticancer effects of alloxanthoxyletin and fatty acids esters – in vitro study on cancer HTB-140 and A549 cells*”) o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF równym 6,555 i sumarycznej punktacji MNiSW 200. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktoranta w przygotowanie prac jest znaczący w wynosi odpowiednio 50 i 60%.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje niezwykle ważne zagadnienia dotyczące poszukiwania substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz

chemioterapeutyków w terapii nowotworów. Nowatorskim pomysłem było połączenie kwasów tłuszczowych ze związkami heterocyklicznymi. Doktorant otrzymał 30 nowych pochodnych kwasu palmitynowego oraz 11 nowych estrów kwasów tłuszczowych alloksantoksyletyny. Badania biologiczne wykazały wpływ struktury na aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz przeciwnowotworową otrzymanych połączeń. Wykazano wpływ badanych związków na poziom uwalniania interleukiny-6 (IL-6) dla wszystkich badanych linii komórek nowotworowych.

Na uwagę zasługuje fakt, że publikacje wchodzące w skład monotematycznego cyklu przedstawionego przez mgr M. Józwiaka zostały opublikowane w renomowanych czasopismach (*European Journal of Pharmacology, Molecules, Biomedicine & Pharmacotherapy*) o sumarycznym współczynniku oddziaływania IF równym 9,725. Daje to imponującą średnią na jedną publikację $IF=3,25$. Doktorant wykazał się obszerną wiedzą teoretyczną w swojej dyscyplinie oraz umiejętnością konfrontacji swoich osiągnięć naukowych na arenie międzynarodowej. Należy zaznaczyć, że prace te zgodnie z wymogami czasopism, ocenione były wcześniej przez niezależnych ekspertów.

Warto zwrócić uwagę na fakt, że badania dotyczące syntezy nowych pochodnych alloksantoksyletyny i kwasów tłuszczowych o potencjalnej aktywności antyproliferacyjnej finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM 1. Pan Michał Józwiak był również kierownikiem projektu Wydziału Farmaceutycznego „Młodzi Naukowcy” FW113/PM1/17. Pozyskiwanie grantów i projektów badawczych to cenna umiejętność w pracy naukowca i szansa na znaczące publikacje. Doktorant jest współautorem 10 prac naukowych opublikowanych w latach 2016-2020, o sumarycznym $IF=25,028$ i punktacji MNiSW 420. Jak wynika z przygotowanego przez Doktoranta opracowania ilość cytowań 31 oraz *h*-index 4.

Przygotowując autoreferat Autor nie ustrzegł się jednak pewnych błędów edytorskich oraz niezręcznych sformułowań. Przede wszystkim po tytule pracy nie powinno być kropki (strona tytułowa).

Ponadto:

1. W wykazie dorobku naukowego (konferencje naukowe) brakuje tytułu posteru prezentowanego podczas VIII Konwersatorium Chemii Medycznej (str.88).
2. Wyjaśnienia skrótów w j. angielskim powinny być napisane kursywą.
3. W zdaniu „*W swojej pracy badawczej wykorzystałem połączenia kwasów tłuszczowych z układami heterocyklicznymi. Substratem wyjściowym były tiosemikarbazydy, które przekształciłem w procesie hydrolizy zasadowej w układ 1,2,4-triazolu, a w procesie hydrolizy kwasowej w układ 1,3,4-tiadiazolu.*” Chodzi raczej o reakcję cyklizacji pochodnych tiosemikarbazydu, a nie hydrolizę (str.8).

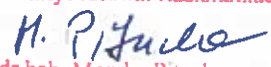
Przytoczone uwagi nie mają wpływu na wartość merytoryczną przygotowanego przez mgr Michała Józwiaka opracowania, które oceniam zdecydowanie pozytywnie.

Podsumowując, stwierdzam, że praca doktorska mgr Michała Józwiaka pt. *„Synteza i badania aktywności biologicznej nowych heterocyklicznych pochodnych kwasów tłuszczowych o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i cytotoksycznym”*, przygotowana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Marty Struga kierownika Katedry i Zakładu Biochemii na Wydziale Lekarskim Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w najwyższym stopniu spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim, 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 r., poz. 1789). Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza umiejętność prowadzenia badań naukowych przez Doktoranta.

Uwzględniając powyższe wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Michała Józwiaka i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualną tematykę i znaczenie prezentowanych badań oraz wysoką aktywność publikacyjną Doktoranta wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa mgr M. Józwiaka.

Samodzielna Pracownia Radiofarmacji
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutycznego
z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
20-093 Lublin, ul. Chodźki 4A
Tel. 81 4487240

Kierownik
Samodzielnej Pracowni Radiofarmacji

dr hab. Monika Pitucha