

Prof. dr hab. Adam Huczynski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii, Zakład Chemii Medycznej
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
e-mail: adhucz@amu.edu.pl
<http://adhucz.home.amu.edu.pl/>

Poznań, 22-04-2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michała Józwiaka

”Synteza i badania aktywności biologicznej nowych heterocyklicznych pochodnych kwasów tłuszczowych o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i cytotoksycznym”

Ocenia przeze mnie rozprawa doktorska Pana mgr Michała Józwiaka stanowi zbiór trzech opublikowanych w latach 2018-2020 i powiązanych z sobą tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym wraz z polskim komentarzem do tych publikacji.

Praca doktorska zatytułowana została ”Synteza i badania aktywności biologicznej nowych heterocyklicznych pochodnych kwasów tłuszczowych o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym i cytotoksycznym”. Zaproponowany temat pracy doktorskiej pokrywa się z tematyką publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Swoje badania Doktorant realizował w Katedrze Biochemii i Chemii Klinicznej Wydziału Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, a jego promotorem jest Pani prof. dr hab. Marta Struga.

Już w tym miejscu warto podkreślić, że badania prowadzone w ramach niniejszego doktoratu możliwe były dzięki finansowaniu ich przez Narodowe Centrum Nauki (program Preludium 13), a mgr Michał Józwiak pełnił rolę kierownika naukowego projektu. Tematyka i projekt badań Doktoranta zostały już zatem wstępnie ocenione i docenione przez grono ekspertów z NCN.

Oceny rozprawy doktorskiej dokonam oceniając wartość naukową przedstawionych do oceny publikacji, mając na uwadze szczególnie oryginalność rozwiązywanych problemów naukowych, a następnie ocenię umiejętność prezentowania uzyskanych przez Doktoranta wyników zwartych w polskim opisie streszczającym prowadzone badania oraz w posumowaniu i wnioskach przedstawionych przez Autora rozprawy.

Pierwszą pracą wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej jest praca przeglądowa: Michał Józwiak, Anna Filipowska, Ferdinando Fiorino, Marta Struga „Anticancer activities of fatty acids and their heterocyclic derivatives”, *European Journal of Pharmacology*, Vol. 871, 2020, 172937.

Jako recenzentowi niezwykle podoba mi się pomysł włączenia pracy przeglądowej do rozprawy doktorskiej, gdyż umiejętność napisania dobrego artykułu przeglądowego niesie za sobą konieczność bardzo głębokich i intensywnych poszukiwań literaturowych i pozwala wykształcić naukowca, który dokładnie wie co napisano w najnowszej literaturze, w tematyce prowadzonych przez niego badań. Niniejszy artykuł przeglądowy jest doskonałym opisem aktualnych wyników badań związanych z syntezą i badaniami właściwości biologicznymi pochodnych kwasów tłuszczowych. Publikacja ma 4 autorów. Z załączonych oświadczeń współautorów, wynika iż największy nakład pracy był udziałem Doktoranta i wynosił on aż 70%.

W pierwszej części artykułu przeglądowego autorzy opisali wpływ wolnych nasyconych, nienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na funkcje biologiczne i metabolizm różnych typów komórek nowotworowych. Druga część artykułu opisuje koniugaty różnych kwasów tłuszczowych ze stosowanymi lekami przeciwnowotworowymi i różnymi ugrupowaniami heterocyklicznymi.

Niniejsza praca stanowi jakoby swoiste wyznanie wiary Doktoranta i doskonałe uzasadnienie podjętych przez niego badań nad modyfikacjami kwasów tłuszczowych, ponieważ z omówionych danych literaturowych wynika wprost, że przyłączenie cząsteczki kwasu tłuszczowego (zwłaszcza wielonienasyconego) często poprawia selektywność działania związków cytotoksycznych.

Z obowiązku recenzenta zauważyłem dość ciekawy (raczej błędny) opis omawianego artykułu, zarówno w wersji drukowanej jak i na stronach wydawnictwa (<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172937>). Artykuł ten zakwalifikowano jako *Full length article*, choć powinien być przypisany do kategorii *Review article*. Niewłaściwe przypisanie kategorii artykułu może być jednak konsekwencją działań wydawcy i mogło umknąć autorom podczas korekty.

Drugą publikacją wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej jest artykuł badawczy: Michał Józwiak, Karolina Stępień, Małgorzata Wrzosek, Wioletta Olejarz, Grażyna Kubiak-Tomaszewska, Anna Filipowska, Wojciech Filipowski, Marta Struga, "Synthesis, Structural Studies and Biological Evaluation of Connections of Thiosemicarbazide, 1,2,4-Triazole and 1,3,4-Thiadiazole with Palmitic Acid", *Molecules*, 2018, 23 (4), 822.

Doktorant w swoim oświadczeniu wskazał, że odpowiedzialny był syntezę i analizę spektroskopową związków, przeprowadzenie badań biologicznych oraz opracowanie wyników oraz redakcję manuskryptu. Swój wkład pracy w powstanie manuskryptu ocenił na 50%, co znalazło również potwierdzenie w oświadczeniach pozostałych autorów. Docenieniem wkładu pracy mgr Michała Józwiaka jest również jego rola pierwszego autora.

Patrząc okiem chemika na omawianą pracę chciałbym podkreślić, że otrzymanie trzech serii związków (łącznie 30 nowych związków) oraz ich pełna analiza spektroskopowa wymagały niemałego wkładu pracy. Jeżeli jeszcze dodamy do tego samodzielne przeprowadzenie badań biologicznych, to widzimy tytaniczny rozmiar pracy eksperymentalnej Doktoranta. Z załączonego życiorysu Pana Michała Józwiaka wynika, że ukończył on studia biologiczne, dlatego chciałbym w tym miejscu zadać niezobowiązujące pytanie: Co było dla niego większym wyzwaniem - synteza czy badania biologiczne? Myślę, że odpowiedz na to pytanie chętnie usłyszeli by też inni członkowie Komisji Doktorskiej.

Uzyskane nowe pochodne kwasu palmitynowego zostały w pełni scharakteryzowane przy użyciu ^1H i ^{13}C NMR, HRMS, temperatury topnienia. Choć

nie ma takiego zwyczaju, warto byłoby w mojej ocenie pokazać również w doktoracie suplement do publikacji, bo jak mówi stare porzekadło chemika organika: „po widmach jakoś pracy poznacie”. Ponieważ Doktorant nie załączył suplementu do omawianej publikacji, jako dociekliwy recenzent przejrzałem go na stronie wydawnictwa. I tu pojawia się moje drugie: pytanie: Dlaczego w suplemencie do publikacji nie pokazano wszystkich widm ^{13}C NMR, a tylko widma związków 1, 5, 1a, 5a, 1b oraz 5b?

Aktywność biologiczna otrzymanych związków nie była zbyt wysoka. Były one nieaktywne wobec komórek nowotworowych i słabo aktywne wobec bakterii. Cztery związki wykazały natomiast interesującą aktywność przeciwgrzybiczą wobec *Candida albicans*.

Za dość niefortunny uznaje zapis „ $\text{IC}_{50} > 100$ ”, bez podania jednostki stężenia, pojawiający się zarówno w publikacji, jak również w polskim komentarzu do publikacji (str. 29).

Mam pytanie do Doktoranta: Czy w związku z dość ograniczoną aktywnością przewiduje jeszcze jakieś inne, dodatkowe badania biologiczne swoich związków, czy widzi dla nich jakieś inne cele molekularne czy terapeutyczne?

Trzecią publikacją wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej jest praca: Michał Józwiak, Marta Struga, Piotr Roszkowski, Agnieszka Filipek, Grażyna Nowicka, Wioletta Olejarz, "Anticancer effects of alloxanthoxyletin and fatty acids esters – In vitro study on cancer HTB-140 and A549 cells", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, Vol. 110, 618-630.

Z oświadczeń Doktoranta jak i pozostałych współautorów wynika jednoznacznie, że wniósł On największy wkład pracy potrzebnej do przygotowania tej publikacji i szacowany jest on na 60 %. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że podziwiam i doceniam bardzo umiejętność prowadzenia przez mgr Michała Józwiaka zawansowanych i czasochłonnych badań, zarówno chemicznych (synteza, oczyszczanie, analiza spektroskopowa), a także różnorodnych badań biologicznych. W dobie kształcenia doktorantów bardzo często specjalizujących się w tylko wąskich

dyscyplinach naukowych, czy też będących specjalistami od tylko wybranych technik badawczych, takie ogólne i wielospecjalistyczne umiejętności są dziś rzadkością. I miło mi konstatować, że w nauce pojęcie „człowiek orkiestra” jeszcze nie przeminęło.

W pracy tej opisano syntezę jedenastu nowych estrowych pochodnych alloksantoksyletyny (pochodnej kumaryny), badania spektroskopowe oraz badania biologiczne, takie jak: cytotoksyczność metodą MTT, migracja komórek, testy na uczulanie, badania proapoptyczne z użyciem cytometrii przepływowowej, badania uwalniania interleukiny 6 z użyciem techniki immunoenzymatycznej ELISA. Tyle badań musiało przynieść interesujące rezultaty.

Badane związki były estrowymi koniugatami różnorodnych kwasów tłuszczowych (z krótkimi, długimi, nienasyconymi i wielonienasyconymi resztami alkilowymi). Materiał ten stanowił więc doskonałe podłoże do przeprowadzenia analizy korelacji struktura – aktywność biologiczna (SAR). Koniugacja pochodnej kumaryny z kwasami tłuszczowymi była ciekawą koncepcją, gdyż estrowe pochodne z kwasami tłuszczowymi mogą polepszać jej rozpuszczalność, biodostępność oraz selektywność działania przeciwnowotworowego.

Badania Doktoranta pokazały, że koniugacja z nienasyconymi i wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, takimi jak kwas oleinowy (związek 8), kwas α -linolenowy (związek 9), sprzężony kwas linolowy CLA (związek 10), kwas dokozaheksaenowy DHA (związek 11) poprawia cytotoksyczność wobec linii komórkowych ludzkiego czerniak skóry (HBT-140) oraz nowotworu płuc (A549) i nieznacznie poprawia selektywność działania wobec normalnych ludzkich komórek naskórka pochodzenia ektodermalnego – keratynocytów HaCaT. Podobnie te pochodne (związki 9-11) znacząco hamowały migrację komórek nowotworowych, a także były dobrymi induktorami wczesnej apoptozy w komórkach nowotworowych.

W Tabeli 1 oraz w omawianej publikacji brakuje mi wzmianki na temat aktywności przeciwproliferacyjnej (oraz innych właściwości biologicznych) związku wyjściowego A. Skoro przebadano bardzo dokładnie aktywność pochodnych alloksantoksyletyny uważam, że warto byłoby również podać wyniki badań

aktywności biologicznej dla związku wyjściowego, wtedy tak recenzent, jak i czytelnicy, wiedzieliby czy przeprowadzone modyfikacje chemiczne zmieniają (poprawiają, pogarszają) aktywność biologiczną związku wyjściowego. Proszę Doktoranta o stosowny komentarz podczas obrony.

W suplemencie do publikacji (na stronach wydawnictwa) znalazłem kopie widm ^1H i ^{13}C NMR, jednoznacznie potwierdzające strukturę otrzymanych związków oraz ich czystość.

Na stronie 57 jak i w podsumowaniu na stronie 77 Doktorant napisał, iż stosowanie pochodnych 8-10 zmniejszyło uwalnianie IL-6. Pozostawiając jednak ten fakt bez żadnego komentarza. W tym miejscu proszę o komentarz: Co z tego faktu wynika?

Z wielką przyjemnością i naukowym zainteresowaniem czytałem rozprawę doktorską mgr Michała Józwiaka. To bardzo dobrze zestawione trzy publikacje, których głównym autorem był Doktorant. W pracach tych opisano badania biologiczne związków, które syntezował Doktorant. Publikacje ukazały się w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o dobrach współczynnikach oddziaływania $\text{IF} > 3$.

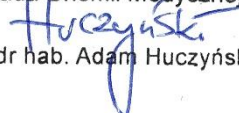
Polski komentarz do tych publikacji utwierdził mnie w przekonaniu, że Doktorant potrafi w skróconej formie opisać swoje badania, akcentując sukcesy. Dwustronicowe podsumowanie i wnioski rzeczowo oddają sens prowadzonych badań.

Badania mgr Michała Józwiaka stanowią cenny wkład do współczesnej nauki. Ponad 40 nowych związków, trzy bardzo dobre publikacje, doskonały polski opis prowadzonych badań pozwalają mi z pełnym przekonaniem stwierdzić, że oceniana rozprawa spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymogi dotyczące przyznania stopnia doktora nauk farmaceutycznych, co więcej zasługuje w mojej ocenie na wyróżnienie.

Doktorant wykazał się znakomitym przygotowaniem merytorycznym, wysoką jakością pracy eksperymentalnej (synteza organiczna i badania z udziałem komórek)

oraz umiejętnością analizy danych chemicznych i biologicznych. Zrealizował dobrze sprecyzowane i ambitne zadania badawcze, które zostało już docenione poprzez publikację 2 prac badawczych w bardzo dobrych czasopismach z zakresu chemii bioorganicznej i chemii medycznej. Wyniki badań przeszły zatem również proces recenzji w tych czasopismach.

Doktorant wykazał się również dużą starannością w prowadzeniu badań oraz umiejętnością pozyskiwania funduszy na swoje badania oraz kierowania projektem finansowanym przez NCN. Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Farmacji Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana mgr Michała Józwiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jego rozprawy doktorskiej.

Kierownik
Zakładu Chemii Medycznej

prof. dr hab. Adam Huczyński