

Warszawa, 19.10.2018

dr hab. Arkadiusz Szterk, prof. NIL
Z-ca Dyrektora ds. Naukowych
Kierownik merytoryczny
Zakładu Metod Spektrometrycznych
Narodowy Instytut Leków w Warszawie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Fedorowicz pt. „Synteza i zastosowanie
izoksazolo[3,4-b]pirydyn-3(1*H*)-onów”

Wykonanej pod kierunkiem Pana dr hab. Jarosława Sączewskiego w Katedrze i Zakładzie
Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej,
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wstęp

Antybiotyki jeszcze do niedawna były najskuteczniejszą bronią w walce z zakażeniami bakteryjnymi. Jednak już w chwili odkrycia tej grupy leków znane było również zjawisko oporności na antybiotyki. Początkowo stanowiło ono problem marginalny, ponieważ na rynku pojawiały się co jakiś czas nowe związki do walki z bakteriami. Dzięki temu nowe leki początkowo wygrywały w wyścigu z antybiotykoopornością drobnoustrojów. Niestety od mniej więcej połowy XX wieku problem oporności na antybiotyki zaczął gwałtownie nabierać znaczenia. Dysproporcja między tempem powstawania i rozpowszechniania się mechanizmów oporności, a wprowadzaniem nowych leków przeciwbakteryjnych stała się tak duża, że opcje terapeutyczne zakażeń bakteryjnych zaczęły ulegać wyczerpaniu. Bezpieczeństwo pacjentów jest poważnie zagrożone. Chorych coraz częściej dotyka brak skuteczności terapii. Narażeni są oni na dodatkowe działania niepożądane antybiotyków i zwiększoną śmiertelność z powodu zakażeń wywoływanych przez odporne drobnoustroje. Antybiotykooporność stała się jednym z podstawowych niebezpieczeństw dla zdrowia publicznego na całym świecie, zagrożeniem porównywanym do takich kataklizmów jak epidemia grypy, katastrofalne powodzie, duże erupcje wulkanów, czy ataki terrorystyczne na dużą skalę. Do takich zagrożeń cywilizacyjnych można porównać problem antybiotykooporności nabywanej przez kolejne szczepy bakterii. Naukowcy, w tym

prof. DWL-2018
25.10.2018
ASZ

epidemiolodzy, z jednej strony dążą do szybkiego uchwycenia nosicieli wieloopornych szczepów bakterii, natychmiastowego wdrożenia właściwych procedur kontroli zakażeń oraz opracowania racjonalnej polityki antybiotykowej uwzględniającej dynamikę i profile antybiotykooporności drobnoustrojów izolowanych w szpitalach. Z drugiej strony, prowadzi się w wielu ośrodkach naukowych krajowych i zagranicznych badania nad poszukiwaniem nowych antybiotyków lub substancji przeciwbakteryjnych, mogących znaleźć zastosowanie terapeutyczne. W świetle powyższego dysertacja Pani mgr inż. Joanny Fedorowicz zbiega się z aktualnymi trendami badawczymi, co czyni ją w pełni zasadną.

Przedstawiona do oceny praca nie jest typowym opracowaniem o charakterze eksperymentalnym. Obejmuje 359 stron, w tym pięciostronicowe streszczenie, 158 rysunków, 24 tabele oraz 67 schematów. Praca składa się z dość obszernego wstępu teoretycznego obejmującego 77 stron, 10-stronicowej genezy łącznie z celem i zakresem prac badawczych, 103-stronicowego opracowania zatytułowanego "badania własne", 71-stronicowego opracowania obejmującego część eksperymentalną, 7-stronicowe podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo obejmuje 22 strony (394 pozycje bibliograficzne) oraz 47 stron aneksu. W pracy nie wyszczególniona została część poświęcona opisowi uzyskanych wyników oraz ich dyskusji. Autorka elementy te połączyła w rozdziale badania własne.

W bardzo rzeczowej części teoretycznej Autorka wprowadza czytelnika w zagadnienie i uzasadnienie wyboru tematu oraz celu badań. Przegląd literatury bardzo dobrze opisuje dotychczasowe badania nad syntezą różnych pochodnych fluorochinolonów, chinolonów i ich zastosowanie jako chemioterapeutyków (syntetycznych antybiotyków) stosowanych w walce z mikroorganizmami głównie z bakteriami. Autorka w szczegółowy sposób charakteryzuje znane modyfikacje fluorochinolonów oraz wskazuje ich właściwości przeciwmikrobiologiczne i cytotoksyczne. W bardzo przejrzysty sposób opisane zostały kompleksy metali z fluorochinolonami, otrzymywanie mikrocząstek, nanocząstek, nanoleków, polimerów na bazie różnych fluorochinolonów oraz połączenia fluorochinolonów z białkami i peptydami. Opisane zostały również połączenia fluorochinolonów z różnymi analogami i donorami tlenu azotu, w tym z benzofuroksanami, wykazujące w połączeniu silne działanie przeciwbakteryjne, przy jednoczesnej niskiej cytotoksyczności. Autorka bardzo treściwie dokonała opisu syntezy hybryd anionowych na bazie fluorochinolonów, połączeń sideroforów z fluorochinolonami lub chinolonami, proleków, fototerapeutyków, pochodnych triazolowych, leków hybrydowych, homodimerycznych i/lub heterodimerycznych koniugatów chinolonów i/lub fluorochinolonów i ich pochodnych. W przedostatnim

podrozdziale wstępu teoretycznego autorka opisała inne nietypowe modyfikacje fluorochinolonów i ich potencjalne zastosowanie przeciw-mikrobiologiczne. Do wstępu teoretycznego można mieć zasadniczo jedną uwagę związaną ze zbyt szczegółowymi opisami procesów syntezy pochodnych fluorochinolonów oraz zbyt szczegółowymi opisami doświadczeń *in vitro* i *in vivo*, w tym badań klinicznych (przykładowo na stronach 29, 73, 79 i 85). Można mieć również ogólną uwagę do całości pracy związaną ze sposobem cytowania literatury. Zdecydowanie łatwiej jest znaleźć pozycję literaturową w spisie literatury jeśli Autorka dodałaby rok publikacji powołując się na pracę np. Hu i współpracowników i podając w nawiasie rok publikacji. Dodatkowo stosowanie skrótu np. Hu i in. też skróciłoby tą pracę. Oczywiście tego rodzaju drobne błędy nie ujmują wartości merytorycznej dysertacji.

W rozdziale geneza, cel i zakres prac badawczych (100 strona pracy) ponownie podjęto próbę uzasadnienia celowości pracy. W mojej ocenie nie było to potrzebne, gdyż w części teoretycznej w mistrzowski sposób Autorka uzasadniła zasadność poszukiwania nowych struktur pochodnych fluorochinolonów jak i chinolonów w zakresie ich działania przeciwbakteryjnego jako potencjalnych nowych syntetycznych antybiotyków. Sformułowany został następujący cel badawczy:

„Celem naukowym niniejszej pracy było zaprojektowanie struktury i otrzymanie biblioteki nowych związków o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym oraz zweryfikowanie hipotezy, iż możliwe jest połączenie struktury antybiotyków (fluoro)chinolinowych z czwartorzędowymi solami amoniowymi o strukturze triazoliniowej, a w konsekwencji uzyskanie nowej klasy hybrydowych związków przeciwbakteryjnych, posiadających unikatowy podwójny mechanizm działania, który obejmuje:

- a) zaburzenie funkcjonowania lipidowych błon komórek bakterii chorobotwórczych spowodowane obecnością czwartorzędowego atomu azotu;
- b) hamowanie bakteryjnej gyrazy/topoizomerazy IV DNA wywołane obecnością cząsteczki (fluoro)chinolonu.”

Autorka nie sformułowała w klarowny sposób żadnych dodatkowych celów badawczych. Odnosząc się do zakresu pracy można stwierdzić, że nie jest on w sposób ścisły związany z celem pracy, a raczej z celami dodatkowymi, które nie zostały jednak przedstawione.

Czytając pracę można wychwycić kilka dodatkowych celów badawczych, którym Autorka poświęciła bardzo duży zakres treści. Odnosi się nawet wrażenie, że są one ważniejsze niż postawiony główny cel, gdyż obejmują:

- a) badanie właściwości fluorescencyjnych nowych związków hybrydowych wynikających z obecności pierścienia triazolinowego,
- b) poszukiwanie nowych związków fluorescencyjnych różniących się właściwościami optycznymi, które mogłyby posłużyć jako znaczniki w badaniach analitycznych lub biomedycznych,
- c) poszukiwanie barwników o właściwościach najkorzystniejszych w obrazowaniu mikroskopowym, które to mogłyby w przyszłości służyć do wizualizacji tkanek,
- d) opracowanie metody ilościowej oznaczania aminokwasów oraz amin biogennych z wykorzystaniem nowych znaczników fluorescencyjnych (co ciekawe, materiał badawczy stanowiło wino),
- e) zastosowanie aktywnych estrów N-hydroksysukcynimidowych *Safirinium* różniących się podstawnikami alkilowymi w pierścieniu soli triazolowych jako modyfikatorów zwiększających wydajność jonizacji (miękkich) stosowanych w technikach LC-MS,
- f) zastosowanie N-podstawionych pochodnych izoksazolonów jako substancji grzybobójczych,
- g) zbadanie mechanizmu addycji izoksazolonów do acetylenowych akceptorów Michaela.

Z przedstawionej części teoretycznej nie wynika konieczność zajmowania się tak licznymi celami pobocznymi. Nie jest zrozumiałe, dlaczego Autorka tak bardzo rozbudowała swoją pracę i nie skupiła się na głównym celu badawczym i jaki jest związek dodatkowych celów badawczych z celem głównym? W mojej ocenie każdy dodatkowy wyżej wymieniony cel z powodzeniem może stanowić bardzo dobrą niezależną pracę doktorską.

Odnosząc się do badań własnych, Autorka w bardzo przejrzysty sposób prezentuje uzyskane wyniki. Są one związane z ogólnym tytułem pracy, jednakże tylko w pewnym stopniu wiążą się z celem głównym dysertacji. Pewien niedosyt stanowi brak dyskusji wyników w odniesieniu do światowych danych literaturowych. Wydaje się zasadne, porównanie uzyskanych wartości MIC dla badanych związków dla poszczególnych mikroorganizmów, do wyników innych naukowców, badających różne pochodne fluorochinolonów czy chinolonów, o takim samym lub bardzo podobnym molekularnym mechanizmie działania (inhibitory gyrazy/topoizomerazy IV DNA). Można mieć również zastrzeżenie odnośnie braku podejścia statystycznego do uzyskanych wyników. Badanie właściwości przeciwmikrobiologicznych względem różnych szczepów, testujące dość dużą liczbę nowych związków względem leków macierzystych, wymaga ujęcia statystycznego, które powinno

stanowić narzędzie wspomagające interpretację uzyskanych wyników. Stwierdzenia, typu: „zarówno związki hybrydowe, jak i macierzyste leki były również bardziej aktywne wobec szczepów laboratoryjnych niż klinicznych” powinny być udowodnione statystycznie. Wydaje mi się, że ograniczenie zakresu dysertacji i skupienie się na celu głównym pracy, w tym wykonanie odpowiedniej liczby powtórzeń (dla badań biologicznych minimum $n = 6$), przebadanie uzyskanych związków pod względem przeciw-mikrobiologicznym oraz cytotoksycznym i ujęcie statystyczne wyników byłoby zdecydowanie korzystniejsze i w pełni wystarczające. Natomiast wielowątkowość pracy powoduje, że dzieło staje się dość rozmyte.

W końcowej części pracy Autorka dysertacji podsumowała swoje wyniki formułując liczne wnioski. Przedstawiony cel badawczy w tej części pracy jest inny w porównaniu z celem badawczym zamieszczonym w części „Geneza, cel i zakres pracy”. Autorka podsumowała w tym miejscu część badań chemicznych, analiz teoretycznych, badań biologicznych oraz aplikacyjnych.

Rozważając całość ocenianej pracy należy stwierdzić, że stanowi ona kompleksowe, wyróżniające się wysokim poziomem, opracowanie eksperymentalne, w wielu elementach nowatorskie. Rozprawa naukowa Pani mgr inż. Joanny Fedorowicz pt. „Synteza i zastosowanie izoksazolo[3,4-b]pirydyn-3(1H)-onów” jest wykonana na wysokim poziomie i odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim.

Przedkładam zatem Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie Pani mgr. inż. Joanny Fedorowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

