

Prof. dr. hab. n. med. Zenon Czuba

Zabrze, 25.07.2023r.

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ul. H, Jordana 19,

41-808 Zabrze

Tel.: 32 272 25 54, e-mail: mikroimm@sum.edu.pl . zczuba@sum.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej pod tytułem „Synteza i ocena aktywności biologicznej wybranych pochodnych kwasu dichloromukowego w warunkach *in vitro* wobec modelowych linii komórek nowotworowych” wykonanej przez mgr inż. Annę Byczek-Wyrostek.

Promotor rozprawy doktorskiej: Prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak.

Starzejące się społeczeństwa i warunki środowiska człowieka sprzyjają powstawaniu chorób nowotworowych. Jednocześnie stosowane obecnie leki charakteryzują się ograniczoną skutecznością w terapii onkologicznej. Wynika to z ograniczeń z zakresu poznania mechanizmów powstawania i rozwoju nowotworów oraz niewielkiej liczby nowych, sprawdzonych i skutecznych leków charakteryzujących się jednocześnie działaniem antynowotworowym i niską toksycznością w odniesieniu do organizmu. Stąd poszukiwanie nowych syntetycznych i naturalnego pochodzenia związków o wyższej skuteczności terapeutycznej. Przedstawiona mi do oceny praca doskonale wpisuje się w poszukiwanie nowych syntetycznych związków o wysokiej aktywności biologicznej.

Przeprowadzone badania były współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu OPUS nr 2016/21/B/NZ7/01766 oraz Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach środków przeznaczonych na badania kierowane dla młodych naukowców nr BK-M-518/RCH2/2014, BK-M-505/RCH2/2015 i BK-M-530/RCH2/2016.

Z informacji podanej przez Doktorantkę na stronie 124 rozprawy doktorskiej wynika, że część wyników została już opublikowana w *Pharmaceuticals* w 2021 roku oraz w *European Journal of Medicinal Chemistry* w 2018 roku. W pierwszej pracy Doktorantka jest drugim, a w drugiej pierwszym autorem. Łączny współczynnik oddziaływania IF tych czasopism wynosi 12,303.

Oceniana rozprawa liczy 131 stron i jest napisana zgodnie z wymogami dla tego typu prac. Na początku znajduje się spis treści, wykaz skrótów stosowanych w pracy i wstęp teoretyczny (strony od 10 do 37). W części teoretycznej Doktorantka opisuje 2(5H)-furanon i jego pochodne oraz kwasy halogenomukowe i ich pochodne z uwzględnieniem ich właściwości biologicznych i metod ich syntezy. Wstęp teoretyczny kończy szczegółowy opis cyklu komórkowego i apoptozy komórek. Następnie przedstawiony jest cel pracy w którym, na podstawie wcześniejszych danych z badań biologicznych, postanowiono opracować metody syntezy nowych pochodnych kwasu dihalogenomukowego zawierającego różne podstawniki w pozycji C5 pierścienia 2(5H)-furanonu i określić ich właściwości antyproliferacyjne i przeciwnowotworowe oraz podjąć się próby poznania mechanizmu ich działania. W ten sposób określony cel może stanowić podstawę do opracowania najkorzystniejszych struktur

do dalszych badań *in vivo*. Kolejnym rozdziałem jest omówienie otrzymanych wyników (strony 39-74). Część ta jest podsumowana wnioskami w formie opisowej. W części eksperymentalnej przedstawiono szczegóły syntezy poszczególnych pochodnych 2(5*H*)-furanonu wraz z danymi analizy instrumentalnej otrzymanych związków. W celu potwierdzenia struktur chemicznych otrzymanych związków chemicznych zostały wykorzystane metody ¹H NMR, ¹³C NMR i HR MS. Po części chemicznej zostały bardzo szczegółowo i wyczerpująco opisane metody analizujące właściwości biologiczne otrzymanych związków. Część zasadniczą rozprawy doktorskiej kończy opis zastosowanej analizy statystycznej i składające się ze 119 pozycji piśmiennictwo zestawione w kolejności cytowań. Ostatnie strony przedstawiają obszerny dorobek naukowy Doktorantki, spis konferencji z zaprezentowanymi pracami, nagrody i wyróżnienia, przyznane stypendia, wykaz odbytych szkoleń i kursów oraz spis 6 projektów w których Doktorantka uczestniczyła jako wykonawca. Obszerny zakres odbytych szkoleń i kursów zapewnił Doktorantce dobre opanowanie warsztatu nowych technik badawczych i instrumentalnych z wykorzystaniem linii komórek nowotworowych w badaniach biologicznych.

Przedmiotem badań biologicznych były pochodne kwasu 3,4-dihalogenomukowego w szczególności 3,4,5-trichloro-2(5*H*)-furanon, pochodne 3,4-dihalogeno-5-alkoksykarbonyloksy-2(5*H*)-furanonu, pochodne 3,4-di halogeno-5-alkoksy-2(5*H*)-furanonu, pochodne 3,4-dihalogeno-5-sililoksy-2(5*H*)-furanonu oraz grupę 16 pochodnych 3-chloro-5-alkoksy-2(5*H*)-furanonu z różnymi podstawnikami w pozycji 4, zsyntezowanych w zespole prof. Krzysztofa Walczaka. Halogenkami w badanych związkach był chlor lub brom.

Wszystkie analizowane związki przebadano na czterech liniach komórkowych: BEAS-2B (linia ludzkich komórek prawidłowych wywodzących się z płuc), A549 (linia ludzkich komórek nowotworowych raka płuca), HCT 116wt (linia ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego) oraz HCT 116p53-/- (linia ludzkich komórek nowotworowych jelita grubego z delecją obu genów kodujących białko p53). Do oceny cytotoksyczności wykorzystano test redukcji MTT, który jest powszechnie stosowany w takich badaniach. Pozwoliło to wybrać najbardziej aktywne związki. Zastosowanie linii prawidłowych komórek z płuc umożliwiło obliczenie indeksu selektywności. Wybrane związki przebadano także na innych liniach komórek nowotworowych. W sumie wykorzystano 12 linii komórek nowotworowych i linię komórek prawidłowych. W badaniach Doktorantka posłużyła się także obliczonym współczynnikiem podziału badanych związków. W próbach kontrolnych zastosowano 5-florouracyl oraz stosowane w reakcjach chlorki sililowe. Najbardziej aktywne związki poddano dalszym badaniom uwzględniających wpływ na indukcję apoptozy, cykl komórkowy, indeks mitotyczny oraz oznaczono istotne białka w lizatach komórkowych odpowiedzialne za przebieg apoptozy. Całość badań biologicznych została prawidłowo zaprojektowana i wykonana z wykorzystaniem nowoczesnej aparatury, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Wykonana praca oraz prawidłowa analiza wyników mogą być bardzo pomocne przy dalszym projektowaniu nowych leków.

Na szczególną uwagę zasługuje dorobek naukowy uwzględniający indeks oddziaływania (IF) czasopism naukowych, w których ukazały się prace naukowe, gdzie Doktorantka jest współautorem. IF dwóch prac opublikowanych na podstawie wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej wynosi 12,303, a po dodaniu IF ośmiu pozostałych prac suma IF=60,951.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na drobne błędy zauważone w rozprawie doktorskiej:

- strony 4, 24, 27, 45, 48 zamiast „raka płuc” powinno się użyć „raka płuca”,
- strona 14, powinno być „Gram-dodatnich”, nazwa barwienia pochodzi od Hansa Christiana Grama i powinna być pisana dużą literą, podobnie powinno być na stronie 16,
- strona 14, nazwa „*Salmonella typhimurium*” powinna być obecnie pisana „*Salmonella enterica*, serowar Typhimurium” lub w skrócie „*Salmonella* Typhimurium”,
- strona 15, w miejsce „badań Zang’a” powinno być „badań Zanga”, ponieważ nazwisko kończy się spółgłoską,
- strona 17, w miejsce „*Streptococcus aureus* ATCC 25923” powinno być „*Staphylococcus aureus* ATCC 25923”,
- strona 19, powinno być „pochodnych 5-alkoksy-2,5-dihydrokso-3-fenylofuran-2-onu”,
- strona 25, powinien być numer rysunku 25, a nie 35. Nastąpił przeskok numerów o 10,
- strona 31, powinien być numer rysunku 40, a nie 41, natomiast te same numery rysunków 42,43 są także na kolejnej stronie,
- strona 36, literówka w pierwszym zdaniu,
- strona 37, literówka w czwartej linii,
- strona 39, literówki w 12 linii.

Powyższe drobne błędy nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy.

Podsumowując przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie naukowe i wnosi istotny wkład do dyscypliny nauk chemicznych.

Według mojej oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Byczek-Wyrostek spełnia wszystkie kryteria określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595, z późn. zm.).

Mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej w Gliwicach z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Anny Byczek-Wyrostek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników i możliwość wykorzystania ich w dalszych opracowaniach związków aktywnych biologicznie oraz mając na uwadze wymagania ogólne dotyczące wyróżnienia pracy doktorskiej na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach **wnioskuję o wyróżnienie** ocenianej rozprawy doktorskiej. Dodatkowo chciałbym zaznaczyć, że praca opublikowana w *European Journal of Medicine Chemistry* 2018, 150,687-697, której wyniki zostały uwzględnione w rozprawie doktorskiej i Doktorantka jest pierwszym autorem, spotkała się z zainteresowaniem innych badaczy i została zacytowana 16 razy (Web of Science, bez autocytowań, dane z 25.07.2023r.).

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
prof. dr hab. n. med. Zenon Czuba