



Kraków, 20 marca 2024 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Joanny Krajewskiej pt. „**Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków z grupy pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych**”.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Joanny Krajewskiej przygotowana została pod naukowym kierunkiem promotora, Pani dr hab. Agnieszki E. Laudy na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Doktorantka podjęła tematykę poszukiwań nowych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych oraz prób opracowania nowej strategii oceny potencjału selekcjonowania lekooporności wśród szczepów bakteryjnych, strategii użytecznej na wczesnym etapie badań przedklinicznych *in vitro*. Autorka dysertacji wyraźnie zainspirowała się największym problemem współczesnej medycyny i biologii, notowaną od ponad dwóch dekad pandemią lekooporności wśród patogennych drobnoustrojów. Zjawisku utraty wrażliwości a nabywania oporności towarzyszą doniesienia o malejącej w leczeniu zakażeń i zarażeń skuteczności znanych antybiotyków i chemioterapeutyków. Systematyczne raporty WHO i EUCAST publikują alarmujące raporty mówiące o zgonach spowodowanych tymi przyczynami; blisko 5 mln zgonów w skali globalnej w 2019 roku z tendencją wzrostową i szacowaną liczbą 10 mln zgonów rocznie do roku 2050. Środowiska epidemiologów i mikrobiologów już mówią o początku ery poantybiotykowej. Na dzień dzisiejszy liczba dostępnych opcji terapeutycznych, które mogłyby zmienić te niekorzystne trendy jest poważnie ograniczona, tak więc oczekiwania środowiska medycznego i farmaceutycznego są jednoznaczne. Oczekuje się wprowadzenia do terapii nowych skutecznych i bezpiecznych leków przeciwdrobnoustrojowych lub środków przywracających skuteczność już znanych. W badaniach przedklinicznych obserwuje się wysoką liczbę związków o obiecującym potencjale przeciwdrobnoustrojowym, włącznie z spełniającymi kryteria innowacyjności WHO, jak związki będące centrum zainteresowania Doktorantki. Jednak badania nad nimi generują kolejne wyzwania – jak wskazać najlepszych kandydatów do dalszych badań, klinicznych i wdrożeniowych? Wynika z tego potrzeba podniesienia precyzji zaawansowanych metod *in vitro* do określenia potencjału kandydatów na leki przeciwdrobnoustrojowe do selekcjonowania lekooporności jak też opracowania swoistych parametrów i metod ich oznaczania.

Przedstawiona powyżej problematyka zainspirowała Panią mgr Joannę Krajewską do podjęcia ambitnych badań w kierunku poszukiwania substancji przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych między związkami

Prof. dr hab. farm.

Jacek Międzobrodzki

Mikrobiolog,
Diagnosta laboratoryjny,
Specjalista zdrowia publicznego

Zakład Mikrobiologii

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

PL 30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 7

tel. +48(12) 664 63 71

tel. +48(12) 664 63 83

fax. +48(12) 664 69 02

jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

chemicznymi nowymi pochodnymi związków boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych oraz opracowanie nowej strategii oceny potencjału selekcjonowania oporności wśród bakterii.

Odpowiedzią na wyzwania wynikające z opisanych powyżej zjawisk jest dysertacja Pani mgr Joanny Krajewskiej, która podjęła się ambitnego zadania przygotowania kolekcji związków chemicznych, zsyntetyzowania i oczyszczenia, a następnie systematycznego ich zbadania, a w kolejnym etapie opracowania oryginalnej metody oceny potencjału selekcjonowania przez związki przeciwdrobnoustrojowe oporności wśród szczepów bakteryjnych, metody możliwej do zastosowania na wczesnym etapie badań przedklinicznych in vitro, w celu wskazania do dalszych badań związku wysoce aktywnego, jak również w najmniejszym stopniu związku generującego narastanie oporności w czasie jego stosowania w terapii.

Badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mgr J. Krajewskiej przeprowadzono w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy naukowej z chemikami Politechniki Warszawskiej w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki – grant OPUS16, projektu kierowanego przez Panią dr hab. Agnieszkę E. Laudy. Grupa badawcza Pani dr hab. A. Laudy wyróżnia się seriami bardzo dobrych publikacji z zakresu poszukiwań nowych środków dezynfekujących i antyseptycznych oraz nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, co w połączeniu z publikacjami na temat mechanizmów lekooporności, ze szczególnym uwzględnieniem roli pompy efluksowej tworzy kompleks tematyczny, który pozwolił autorom ogłaszać wyniki w prestiżowych periodykach indeksowanych w międzynarodowych bazach danych i uzyskać wysoką pozycję naukową. W takim środowisku naukowym została zrealizowana praca doktorska Pani mgr J. Krajewskiej.

Rozprawa doktorska mgr J. Krajewskiej została przygotowana w formie dysertacji złożonej z dwóch części, a każda z nich z kilku rozdziałów. Pierwsza część napisana została w języku polskim, zgodnie z kanonem przyjętym na uniwersytetach, część drugą stanowi zestawienie czterech publikacji, trzech oryginalnych i jednej przeglądowej, będących podstawą doktoratu. Publikacje ogłoszone zostały w latach od 2021 do 2023 w wysoko punktowanych międzynarodowych periodykach. W czterech z nich Pani mgr J. Krajewska jest pierwszym autorem, w jednym drugim. Sumaryczna ich wartość IF wynosi 18,542, a w punktacji MEiN 500,0. Całościowo praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych.

Kompletny maszynopis liczy 230 stron. Część pierwsza składa się z konwencjonalnych części. Po stronie tytułowej przedstawiono źródła finansowania badań z grantu NCN OPUS 16 oraz z Fundacji Rozwoju Diagnostyki i Terapii w Warszawie, miejsce realizacji projektu, i podziękowania (łącznie 1 strona), listę dorobku naukowego (3 strony), na którą składa się wykaz czterech publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej (opisaną powyżej), w dalszym ciągu wszystkich innych publikacji wraz ze streszczeniami z doniesień konferencyjnych międzynarodowych (cztery), krajowych (cztery), informacje o udziale w realizacji grantu NCN OPUS 16 w latach od 2019 do 2024 oraz o aktywności w Polskim Towarzystwie Mikrobiologów, zaangażowaniu w organizację XXIX Ogólnopolskiego Zjazdu Naukowego PTM w Warszawie w 2021 r. Kolejne części to „Spis treści” (1 strona), „Wykaz stosowanych skrótów” (2 strony), „Wstęp” (29 stron), „Cel pracy” (2 strony), „Omówienie wyników i dyskusja” (17 stron), i następujące po zestawieniu publikacji końcowe rozdziały –

„Podsumowanie” (6 stron), „Wnioski” (2 strony), „Bibliografia” (216 cytowanych pozycji na 18 stronach), „Opinie Komisji Bioetycznej (2 strony) i ostatni rozdział „Oświadczenia współautorów publikacji” (19 stron).

Rozprawa zaczyna się rozdziałem „Wstęp”, który merytorycznie jest bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy, integrującym obszary badawcze przedstawione w kolejnych etapach badań. Czytelnik zwraca uwagę na rzetelne wprowadzenie w złożoną problematykę poszukiwania nowych leków, nowych grup związków przeciwdrobnoustrojowym i wymagań statutowych na tle globalnego zjawiska pandemii lekooporności wśród patogennych bakterii. Autorka w akademicki sposób pogłębia tę tematykę o wyzwania wynikające ze zjawiska minimalnego stężenia leku zapobiegającego selekcji mutantów dominujących (MPC-D) i z drugiej strony na temat oporności naturalnej (wrodzonej) dużych populacji bakterii i grzybów, nabywania oporności od innych drobnoustrojów w wyniku HTG, mutacji spontanicznych i punktowych. Zjawiska te prowadzą do selekcji mutantów antybiotykoopornych podnoszących swą liczebność w ogólnej populacji komórek tworzących antybiotykooporną subpopulację. Ważny wątek dotyczy wyznaczania parametru, tzw. minimalnego stężenia zapobiegającego selekcji opornych mutantów (MPC), zwłaszcza już na etapie wczesnych badań przedklinicznych kandydatów na nowe leki przeciwbakteryjne, w celu wskazania do dalszych prac aktywnych związków; nie tylko związków o niskich wartościach MIC, ale również o największych zakresach „okna selekcji mutantów” (MSW). Autorka uwzględniła też odmienną sytuację z pacjentami immunosupresyjnymi. Wskazuje, że apel WHO o konieczności poszukiwań nowych ograniczających narastanie oporności schematów dawkowania zawarty w raporcie pt. „Globalne strategie WHO dotyczące ograniczenia oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe” jest wciąż aktualny, że wciąż istnieje konieczność poszukiwania nowych związków chemicznych przeciwdrobnoustrojowych.

W dalszej części następuje przegląd prac badawczych nad nowymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi w XX i XXI wiekach, ze szczególnym uwzględnieniem leków innowacyjnych pod względem struktury, miejsc uchwytu, mechanizmów aktywności i in. w latach od 2019 do 2021. Potrzeba przyspieszenia opracowywania nowych innowacyjnych kandydatów na leki zwróciła uwagę Autorki na źródła takich substancji, m. in. na pochodne związków boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych. Autorka opierając się na dotychczasowej wiedzy wyszła z założenia, że bor będąc nieodzownym mikroelementem w komórkach bakterii i grzybów pełni rolę nie do końca udokumentowaną, ale nie niezbędną. Brak toksyczności boru oraz jego interesujące właściwości skłoniły Autorkę do podjęcia badań nad związkami boroorganicznymi w aspekcie ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, co więcej, nad przywracaniem skuteczności antybiotyków beta-laktamowych wobec bakterii wytwarzających inaktywujące je enzymy. W dalszym ciągu następuje przegląd inhibitorów boroorganicznych a także o pośredniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, uzupełniony o wyniki aktualnych badań przedklinicznych.

Uwagę czytelnika zwraca znakomite przygotowanie Autorki przedstawiającej ze znanstwem i interesująco wiedzę na poziomach mikrobiologicznym, biochemicznym molekularnym i klinicznym. Rozdział ten znakomicie integruje obszary badawcze przedstawione w kolejnych etapach złożonego projektu.

Cele pracy sformułowane w kolejnym rozdziale „Założenia i cele pracy” są racjonalne, logiczne i nie budzą wątpliwości pod względem przesłanek. Są oryginalnym i wartościowym

wkładem do nauki. Objęły one: i) prace nad poszukiwaniem wśród nowych pochodnych związków boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych substancji przeciwdrobnoustrojowych wykazujących aktywność w stosunku do wielolekoopornych drobnoustrojów, wybranych szczepów bakteryjnych i grzybów drożdżopodobnych; ii) wytypowanie nowych potencjalnych kandydatów na leki, albo nowych struktur wyjściowych do syntezy pochodnych aktywnych biologicznie; iii) opracowanie nowej strategii oceny potencjału selekcjonowania oporności obserwowanej wśród bakterii przez związki przeciwdrobnoustrojowe, strategii możliwej do stosowania na wczesnych etapach badań przedklinicznych *in vitro*, co ma na dalszym celu wskazać kierunek prac nad związkami aktywnymi przeciwdrobnoustrojowo i jednocześnie w najniższym stopniu generującymi narastanie oporności w czasie ich stosowania w terapii. Autorka rozwinęła przedstawione cele ogólne w kolejnym podrozdziale, w którym w punktach syntetycznie przedstawiła cele szczegółowe.

W kolejnym rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja” (17 stron) Autorka w sposób syntetyczny opisała badania zaprezentowane w publikacjach stanowiących podstawę dysertacji; zestawienie ich stanowi kolejny rozdział. Wyniki prezentowane w tych publikacjach zostały przedstawione nie w kolejności ogłaszania, nie realizacji poszczególnych faz projektu, ale w sposób łączny i merytorycznie dobrze przemyślany, z zachowaniem logiki ale i dyscypliny cytowania własnych publikacji. Autorka uzyskała bardzo dużo oryginalnych wyników sprawnie przedstawionych w załączonych publikacjach a skomentowanych w rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja”. Recenzent zwraca uwagę na kilka ważnych aspektów i osiągnięć: i) zbadanie 77 nowo skonstruowanych we współpracy z partnerami chemikami z Politechniki Warszawskiej związków boroorganicznych (44 benzosiloksaboroli i 33 kwasów aryloboronowych); ii) bardzo dobry dobór szczepów drobnoustrojów do badań, 27 przedstawicieli różnych grup zgodnie z zaleceniami EUCAST i amerykańskiej agencji CLSI; iii) w badaniach wyeliminowanie efektu toksycznego badanych związków; iv) w badaniach mechanizmów oporności zwrócenie uwagi na udział pomp efluks usuwających aktywny związek z komórek MDR i hamowanie beta-laktamaz; v) wykonanie analiz zależności między strukturą aktywnego związku a siłą oddziaływania synergistycznego nowych kwasów aryloboronowych z beta-laktamazami; vi) opracowanie nowej metody wyznaczania górnej granicy okna selekcji mutantów (MSW) – wyznaczania potencjału selekcjonowania oporności przez związki przeciwdrobnoustrojowe.

Do szczególnie cennych osiągnięć należą: 1) wykazanie wysokiej bezpośredniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej dla 18 z 44 badanych benzosiloksaboroli wskazanych jako innowacyjna grupa związków o obiecującej aktywności przeciw ziarenkowcom gram-dodatnim; 2) szczególnie wysokiej aktywności przeciwgronkowcowej kwasu 2-fluoro-5-trifluorometylo-1,3-fenyleneodiboronowego; 3) pokazanie, że pochodne kwasów aryloboronowych w liczbie 25 na 33 badanych miały aktywność BLI (inhibitorów beta-laktamowych) w wysokich stężeniach a 17 także w niskich; 4) obiecujące właściwości kwasu orto-fenyleneodiboronowego; 5) synergii kilku badanych grup związków; 6) propozycja nowych parametrów *in vitro* charakteryzujących potencjał związków do selekcjonowania oporności; 7) opracowanie nowej metody otrzymywania inokulum bakteryjnego o wysokiej gęstości.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają bardzo wysoką wartość naukową. Są to poważne osiągnięcia wnoszące cenne informacje w nurcie badań poszukujących nowych leków przeciwdrobnoustrojowych w dobie narastającej lawinowo w skali globalnej lekooporności

i obniżania skuteczności terapeutycznej stosowanych leków. Obok wartości naukowych, zarówno wartości aplikacyjne jak i wskazanie oryginalnych kierunków badań są dodatkowymi wartościami dysertacji.

Kolejnym rozdziałem nr 8 po prezentacji opublikowanych artykułów jest „Podsumowanie” (6 stron) przedstawiające w zwięzłej formie uzyskane wyniki i komentarze podzielone sprawnie na dwa podrozdziały obejmujące: i) poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, gdzie w 7 akapitach Autorka tłumaczy i wyjaśnia znaczenie uzyskanych wyników; i podobnie ii) prace nad nowym podejściem do oceny potencjału do selekcjonowania oporności bakterii przez związki przeciwbakteryjne, analogicznie w 5 akapitach.

Kolejne rozdziały to nr 9 „Wnioski”, zawierający w formie zwięzłej sformułowane w 5 punktach konkluzje wynikające z osiągniętych wyników oraz rozdział 10 „Bibliografia” obejmujący 216 pozycji na 18 stronach, w przeważającej liczbie ogłoszonych w ostatniej dekadzie. *Jest to dowód bardzo dobrego przygotowania Autorki do przeprowadzenia planowanych badań.*

Końcowy rozdział 11 przedstawia opinie komisji bioetycznej wymagane do realizacji projektu.

Strona edytorska i językowa. Oceniana praca została przygotowana bardzo starannie. Tekst jest napisany przejrzystym językiem, zdania są pełne i zrównoważone. Liczne ryciny i tabele zawarte są w kopiach publikacji stanowiących odrębny rozdział 7 dysertacji, natomiast pokazana we „Wstępie” Rycina 1, str. 19 i 20, przygotowana w oparciu o 19 publikacji (cytowanych w rozdziale „Bibliografia”) zwraca pozytywną uwagę swą oryginalnością i obfitą treścią. Wszystkie ryciny są pokazane w atrakcyjnych formach przyciągających uwagę. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika.

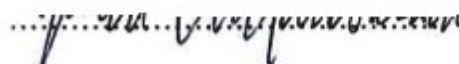
W czasie obrony recenzent zainspirowany pozytywnie projektem Pani mgr Joanny Krajewskiej będzie chciał uzyskać od Doktorantki dodatkowe informacje nt. synergistycznych mechanizmów oddziaływań zbadanych związków, na podstawie własnych doświadczeń a także teoretycznych symulacji i prognoz oddziaływań z przedstawicielami znanych grup antybiotyków, chemioterapeutyków i sulfonamidów. Obok powyższych uwag recenzent przedstawia dodatkowe spostrzeżenia. Z racji obowiązku wskazuje błąd merytoryczny na str. 18, cyt. „komórka macierzysta”; recenzent będzie oczekiwał wyjaśnienia, prawidłowego nazewnictwa komórek. Ponadto znajduje szereg uchybień: i) zjawiska policzalne nie określa się słowami „ilość” lecz „liczba”, i nie „mała” czy „duża” lecz „niska”, „wysoka”; ii) poziom nie „zwiększony” lecz „podniesiony”, związek nie „zwiększa” lecz „podnosi” aktywność, itp. *W podsumowaniu opisu tej części dysertacji recenzent stwierdza, że wykazane uchybienia natury redakcyjnej nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji, ani na całościową wysoką ocenę recenzenta.*

Podsumowanie. Oceniając przedstawiony w dysertacji oryginalny dorobek naukowy Pani mgr farm. Joanny Krajewskiej recenzent stwierdza, że jest to dorobek solidny, wynikający z ambitnej, odważnej i bardzo dobrej koncepcji oraz uzyskany prawidłowo dobranymi metodami badawczymi. Uzyskano bardzo dobre wyniki stanowiące nowość naukową i co więcej wyznaczające nowe kierunki badań i aplikacji. Spostrzeżenia te jednoznacznie wskazują na wysokie kwalifikacje Doktorantki. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została

wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem uniwersyteckim i spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742).

Niniejszym recenzent wnosi do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Krajewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej. Uzasadnienie jest załączone.

Kraków, 20 marca 2024 +



Uzasadnienie

wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Krajewskiej

Rozprawa doktorska pt. „Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków z grupy pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych” zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

1. Rozpoznanie wagi, opisanie i przyjęcie jako wyjściowego stanowiska zjawiska narastania lekooporności wśród patogennych drobnoustrojów i odważne sformułowanie projektu badawczego.
2. Podjęcie systematycznych badań, w pierwszej fazie współpracy ze specjalistami z Wydziału Chemii Politechniki Warszawskiej w zakresie syntezy związków chemicznych, a potem badań ich aktywności biologicznych; badań dobrze zaprojektowanych z doбором właściwie dobranych metod rekomendowanych przez EUCAST i CLSI.
3. Uzyskanie bardzo interesujących wyników – kolekcji nowych związków chemicznych aktywnych biologicznie przeciwdrobnoustrojowych, co więcej otwierających nowe kierunki badań.
4. Wartości aplikacyjne pokazujące perspektywę wprowadzania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych w czasie globalnego zjawiska narastania lekooporności wśród patogennych drobnoustrojów i utraty skuteczności terapii.
5. Propozycja nowych parametrów *in vitro* charakteryzujących potencjał związków do selekcjonowania oporności.
6. Opracowanie nowej metody otrzymywania inokulum bakteryjnego o wysokiej gęstości.

Kraków, 20 marca 2024 r.

