



Gdańsk, 18.03.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Krajewskiej

pt.: „Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków z grupy pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych”

Przedłożona do recenzji praca doktorska została wykonana przez mgr Joannę Krajewską w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr. hab. Agnieszki Laudy.

Podjęta w dysertacji tematyka jest aktualna i uzasadniona ze względu na narastającą oporność drobnoustrojów i postępującą utratę skuteczności dostępnych antybiotyków i chemioterapeutyków, stanowiących poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Konieczne są zarówno działania prowadzące do spowolnienia zjawiska narastania oporności na znane leki przeciwdrobnoustrojowe (m. in. opracowanie schematów dawkowania ograniczających selekcję lekoopornych mutantów) jak i poszukiwanie nowych substancji leczniczych aktywnych wobec wielolekoopornych drobnoustrojów, zwłaszcza tych ujętych na listach patogenów priorytetowych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora w dyscyplinie nauk farmaceutycznych jest spójny tematycznie cykl 5 wieloautorskich prac (1 przeglądowa i 4 oryginalne, liczba współautorów od 2 do 10) opublikowanych w latach 2021 – 2023. Wszystkie prace zostały wydane w trybie „open access”. Sumaryczny impact factor dla tych prac wynosi 18,542 wg bazy *Web of Science* i odpowiada 500 pkt. wg wykazu ministerialnego, co świadczy o wysokim poziomie zrealizowanych badań. Liczba cytowań prac (bez autocytowań) jest niska i wynosi wg bazy *Web of Science* 4, ale od publikacji pierwszych wyników minęły niecałe trzy lata. Godnym podkreślenia jest fakt, że Doktoranta w czterech pracach jest pierwszym autorem, co wskazuje na znaczny wkład Pani mgr Joanny Krajewskiej w ich powstanie oraz znajduje potwierdzenie w opisach udziału Autorki w wykonanych badaniach zamieszczonych w recenzowanej rozprawie jak i oświadczeniach współautorów prac. Pani mgr Joanna Krajewska

była głównym wykonawcą zadań badawczych z zakresu mikrobiologii (publikacje P01-P04), uczestniczyła: w opracowaniu koncepcji prac (P1, P02-P04), w przygotowaniu pierwszej jak i finalnej wersji manuskryptów (P1, P01-P04), w opracowaniu i interpretacji wyników badań mikrobiologicznych (P01-P04).

Publikacje wchodzące w skład rozprawy poprzedzone są 65-stronnicowym opracowaniem zawierającym następujące rozdziały: źródła finansowania, dorobek naukowy, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cele pracy, omówienie wyników i dyskusja, załączniki zawierające pełne teksty publikacji będących podstawą ubiegania się o stopień doktora. Kolejne rozdziały zawierają: podsumowanie, wnioski, bibliografię, opinie komisji bioetycznej i oświadczenia Doktorantki oraz współautorów o ich wkładzie w powstanie prac będących podstawą ubiegania się o stopień doktora.

We wstępie Pani mgr Joanna Krajewska porusza problem narastającej wielolekooporności wśród patogenów i potrzebę poszukiwania nowych antybiotyków i chemioterapeutyków. Jednocześnie zwraca uwagę na brak parametrów określanych we wczesnych etapach badań przedklinicznych *in vitro* substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które pozwalałyby precyzyjnie przewidzieć zakres stężeń, w którym może dochodzić do selekcji opornych mutantów w warunkach *in vivo*. We wstępie Doktorantka opisuje również bor i jego związki wykorzystywane w medycynie. Ta część pracy jest napisana jasno i klarownie, w sposób wyczerpujący wprowadza w zagadnienia związane z tematyką rozprawy doktorskiej. W kolejnej części opracowania Doktorantka przedstawiła cel pracy, w którym określiła w zwięzły sposób zamierzenia badawcze, tj. poszukiwanie nowych pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych wykazujących aktywność wobec bakterii i grzybów drożdżopodobnych oraz opracowanie nowego podejścia do oceny potencjału selekcjonowania oporności wśród szczepów bakteryjnych przez związki przeciwbakteryjne, możliwego do zastosowania na wczesnym etapie przedklinicznych badań *in vitro*.

W pierwszej publikacji (P1) Pani mgr Joanna Krajewska dokonała przeglądu oryginalnych leków przeciwbakteryjnych zarejestrowanych przez Europejską Agencję ds. Leków po publikacji listy patogenów priorytetowych przez WHO w 2017 roku. Ta praca bardzo dobrze charakteryzuje najnowsze leki przeciwbakteryjne i ukierunkowuje badania

podjęte przez Doktorantkę na najistotniejsze potrzeby w poszukiwaniach nowych substancji przeciwbakteryjnych.

W recenzowanej dysertacji Doktorantka poszukiwała nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych wśród 77 nowych związków, w tym benzosiloksaboroli i pokrewnych heterocykli o rozszerzonym pierścieniu (44 związki, publikacje P01 i P02) oraz kwasów aryloboronowych (33 związków, publikacja P04). Benzosiloksaborole benzenosulfonianowe oraz sulfonamidowe wykazywały aktywność przeciwgronkowcową i przeciwentero kokową porównywalną lub wyższą niż aktywność linezolidu (także wobec klinicznych szczepów MRSA). Kluczowe znaczenie dla uzyskania wysokiej aktywności benzosiloksaboroli wobec ziarenkowców Gram-dodatnich miała obecność w cząsteczce ugrupowania benzenosulfonianowego (publikacja P01) lub sulfonamidowego (publikacja P02), a na wzrost ich aktywności wpływała obecność w pierścieniu benzenowym podstawnika chloru lub grupy trifluorometylowej w pozycji *para*, obu tych podstawników lub dwóch atomów chloru w pozycji *para* i *meta* lub trzech grup metylowych w pozycji 2, 4 i 6 (publikacja P01). Z kolei związki boraheterocykliczne o rozszerzonym pierścieniu nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnej (publikacja P02). Doktorantka wykazała również, że aktywność bezosiloksaboroli wobec ziarenkowców Gram-dodatnich wynika najprawdopodobniej z ich wiązania się z syntetazą leucylo-tRNA (publikacja P02). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zachęcają do projektowania kolejnych związków o działaniu przeciwbakteryjnym w oparciu o struktury benzosiloksaboroli.

Ponadto Pani mgr Joanna Krajewska wykazała, że badane beznosiloksaborole nie wykazują istotnej aktywności wobec grzybów drożdżopodobnych ani bakterii Gram-ujemnych (publikacje P01 i P02), a związki boraheterocykliczne o rozszerzonym pierścieniu nie były aktywne wobec badanych szczepów bakterii (publikacja P02).

W czwartej z prac (P03) wchodzącej w skład cyklu Doktorantka przedstawiła badania w ramach których opracowała: (1) nowe parametry *in vitro* do wyznaczania górnej granicy okna selekcji mutantów (MSW), tj. parametr MPC-D (odnoszący się do tzw. dominujących mutantów o wysokim potencjale selekcyonowania także *in vivo*) oraz parametr MPC-F (odnoszący się do mutantów o obniżonej sprawności); (2) nową metodę rozcieńczeń w bulionie do wyznaczania wartości MPC-D i MPC-F (3) oraz nową, wielostopniową metodę

otrzymywania inokulum bakteryjnego o wysokiej gęstości ($>10^{11}$ CFU/ml), zwiększającego precyzję wyznaczania zaproponowanych parametrów.

W ostatniej (P04) z publikacji wchodzących w skład cyklu Pani mgr Joanna Krajewska przedstawiła badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej kwasów aryloboronowych, spośród których najbardziej aktywne wobec gronkowców i enterokoków były: kwas 2-merkaptofenyloboronowy oraz kwas 2-fluoro-5-trifluorometylo-1,3-fenylenodiboronowy. Ponadto kwasy fenylenodiboronowe wykazywały wysoką aktywność jako inhibitory enzymów typu KPC/AmpC, nie wykazując jednocześnie aktywności cytotoksycznej w zakresie stężeń, w którym obserwowano ich aktywność przeciwbakteryjną. Wyniki przeprowadzonych przez Doktorantkę badań wskazują iż kwasy fenylenodiboronowe są obiecującymi strukturami wyjściowymi do projektowania inhibitorów β -laktamaz bakterii Gram-ujemnych, zwłaszcza enzymów typu KPC.

Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 6 publikacji i 8 doniesień na konferencjach krajowych i międzynarodowych (1-komunikat ustny, 1 poster i 6 e-posterów). Ponadto Doktorantka uczestniczyła w realizacji projektu badawczego NCN w programie OPUS i jest członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że praca zawiera istotne elementy nowości naukowej: wykazano, że benzosiloksaborole benzenosulfonianowe i sulfonamidowowe mogą być postrzegane jako potencjalne źródło nowych leków aktywnych wobec priorytetowych ziarenkowców Gram-dodatnich, a kwasy fenylenodiboronowe są interesującymi strukturami wyjściowymi do syntezy nowych inhibitorów β -laktamaz typu KPC/AmpC. Wykazano także, iż wartości zaproponowanego parametru MPC-D mogą być niższe, bardziej powtarzalne *in vitro* i lepiej odtwarzalne *in vivo* niż wartości MPC, co może usprawnić badania przedkliniczne kandydatów na nowe leki przeciwbakteryjne oraz ułatwić opracowanie nowych, ograniczających narastanie oporności schematów dawkowania.

Z pełnym przekonaniem uznaję, że oceniana przeze mnie praca spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy – tekst jednolity: Dz. U. 2023 r. poz. 742) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego

Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Krajewskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo duży wkład włożony w przygotowanie pracy, zakres i jakość przeprowadzonych badań oraz wartość wyników zawartych w recenzowanej pracy wnioskuję o wyróżnienie.

Pani mgr Joanna Krajewska wg załączonych oświadczeń bardzo aktywnie uczestniczyła w realizacji recenzowanej pracy naukowej nie tylko poprzez wykonywanie zadań badawczych z zakresu mikrobiologii (publikacje P01-P04), ale również brała udział w opracowaniu koncepcji prac (P1, P02-P04), analizie i interpretacji wyników badań mikrobiologicznych jak również w redagowaniu pierwszej jak i finalnej wersji manuskryptów (P1, P01-P04). Wyniki badań przeprowadzonych w ramach osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora zostały przedstawione w 5 publikacjach z listy JCR (sumaryczny IF 18,542), a w 4 z nich była pierwszym autorem. Dane naukometryczne świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu się Doktorantki do badań, oraz wysokiej jakości przeprowadzonych eksperymentów i uzyskanych wyników.

Wydane publikacje niewątpliwie wnoszą istotne elementy nowości. Pani mgr Joanna Krajewska nie tylko wykazała, że benzosiloksaborole benzenosulfonianowe i sulfonamidowowe mogą być wykorzystywane jako potencjalne źródło nowych substancji leczniczych aktywnych wobec priorytetowych ziarenkowców Gram-dodatnich, a kwasy fenylenodiboronowe posłużyć jako struktury wyjściowymi do projektowania i otrzymywania nowych inhibitorów β -laktamaz typu KPC/AmpC, ale zaproponowała również nowy parametr MPC-D, oznaczanie którego ma szansę usprawnić badania nad poszukiwaniem nowych substancji leczniczych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym czy określaniu schematów dawkowania antybiotyków lub chemioterapeutyków.

Int. med. ...