

Łódź dnia 22 marca 2024 r.

RECENZJA



rozprawy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Pani mgr farm. Joanny Krajewskiej pt. "Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków z grupy pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych."

W środowiskach medycznych szeroko poszukiwane jest rozwiązanie dla problemu wielooporności drobnoustrojów i kryzysu antybiotykoterapii. Widmo narastającej liczby zgonów milionów ludzi z powodu bakteryjnych infekcji jest prognozowane na najbliższe lata w realnych wskaźnikach epidemiologicznych.

Do istotnych kierunków badań naukowych, które obok powszechnej racjonalnej antybiotykoterapii mogą powstrzymać ten proces, jest poszukiwanie nowych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Doświadczenie jakie zdobyliśmy przy wprowadzaniu kolejnych preparatów pozwala widzieć jak istotną kwestią jest niedopuszczanie do powstawania i powstrzymywanie selekcji opornych mutantów drobnoustrojów. Ich selekcja dokonuje się na naszych oczach przy każdym zastosowaniu antybiotyków czy chemioterapeutyków w leczeniu.

W nurt badań nad poszukiwaniem nowych chemioterapeutyków i monitorowaniem zagrożeń ze strony szybko powstających mutantów opornych włącza się szeroko praca doktorska Pani mgr farm Joanny Krajewskiej.

Autorka postawiła sobie dwa główne cele.

- Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej nowych związków boru: pochodnych boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych.
- Opracowanie nowych wytycznych dla badań przedklinicznych *in vitro* związków przeciwbakteryjnych, w tym związków proponowanych we własnych badaniach, które pozwolą uniknąć narastania oporności w trakcie stosowania tych leków w praktyce.

Przedstawione w pracy doktorskiej mgr farm. Joanny Krajewskiej badania zostały wykonane w ramach realizowanego przez konsorcjum Politechniki Warszawskiej i Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego projektu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Tytuł projektu to „Poszukiwanie korelacji struktura-aktywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych grup związków boraheterocyklicznych”

Badania Doktorantka wykonywała w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotorskim prof. dr hab. Agnieszki E. Laudy.

Rozprawa doktorska mgr farm. Joanny Krajewskiej jest zbiorem czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Wyniki badań zawarte są w trzech wieloautorskich publikacjach:

- P.Pacholak, J.Krajewska, P.Wińska, J.Dunikowska, U.Głogowska, J. Mierzejewska, K.Durka, K.Woźniak, A.E.Laudy, S.Luliński „Development of structurally extended benzosiloxaboroles – synthesis and in vitro biological evaluation” RSC Adv 2021,11, 25104 (IF=4,036)
- J.Krajewska, K.Nowicki, K.Durka, P.H.Marek-Urban, P.Wińska, T.Stępniewski, K.Woźniak, A.E.Laudy, S.Luliński “Oxazoline scaffold in synthesis of benzosiloaxaboroles and related ring-expanded heterocycles: diverse reactivity and structural peculiarities and antimicrobial activity” RSC Adv. 2022,12, 23091(IF=3,9)
- J.Krajewska, P.Chyży, K.Durka, P.Wińska, K.A.Krzyśko, S.Luliński, A.E.Laudy “Aromatic Diboronic Acids as effective KPC/AmpC inhibitors”, Molecules 2023,28,7362 (IF=4,6)

W obszernej pracy przeglądowej autorstwa: Krajewska J, Laudy A.E. „The European medicines Agency approved the new antibacterial drugs – response to the 2017 WHO report in the global problem of multi-drug resistance” opublikowanej w *Advancements of Microbiology*, 2023, 60,4,245-264 (IF=1,106) zawarte są przesłanki dla podjęcia i podejścia do tematu badawczego podjętego w rozprawie. Publikacja ta pokazuje wiele ciekawych, wybranych z najnowszych pozycji literatury danych dotyczących najistotniejszych potrzeb w zakresie konieczności ograniczania narastającej oporności wśród patogenów priorytetowych na aktualnie stosowane leki przeciwdrobnoustrojowe.

Obok tych czterech publikacji doktorantka przygotowała bardzo staranny, obszerny opis obejmujący:

- Wykaz swojej aktywności naukowej, w tym inne publikacje, informacje o uczestnictwie w międzynarodowych i krajowych konferencjach i projektach badawczych.
- Streszczenia w języku polskim i angielskim.
- Szeroki wstęp przedstawiający aktualne możliwości terapeutyczne w leczeniu infekcji, problem selekcji antybiotykoopornych mutantów bakteryjnych i wynikające z niego uzasadnienie podjętych przez siebie badań. We wstępie Autorka przedstawia też tematykę obiecujących właściwości przeciwdrobnoustrojowych kwasów boronowych, benzoksaboroli i benzosiloksaboroli. Wprowadzenie w ostatnich latach nowego inhibitora beta-laktamaz warobaktamu, który jest związkiem boroorganicznym zachęca do badania kolejnych związków boroorganicznych zarówno cyklicznych jak i niecyklicznych oraz benzoksaboroli jak i benzosiloksaboroli. Związki te, jak pokazała Doktorantka mają potencjał nie tylko jako inhibitory beta-laktamaz, ale także jako związki o bezpośredniej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ten wstęp jest znakomitą wprowadzeniem w tematykę badań.
- Ponadto w opisie pracy znalazł się rozdział przedstawiający jej założenia i cele.
- Rozdział zatytułowany: Omówienie wyników i dyskusja wiąże teksty publikacji naukowych składających się na dysertację w logiczną spójną całość.

W swoich badaniach Doktorantka zbadala aż 77 nowo otrzymanych związków boraheterocyklicznych i kwasów aryloboronowych. Badania ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej objęły nie tylko standardowe oznaczenie ich aktywności (MIC, MBC, MFC) w stosunku do grupy wzorcowych szczepów bakterii i grzybów drożdżopodobnych, ale też określanie mechanizmu ich usuwania z komórek bakteryjnych przez wyznaczenie wartości MIC w obecności inhibitorów pomp błonowych. Dokonano też oceny ich zdolności do hamowania aktywności beta-laktamaz bakterii gramujemnych, a także ocenę działania synergistycznego ze znanymi antybiotykami. Poszczególne preparaty wykazywały zróżnicowane, indywidualne działanie co było komentowane i dyskutowane przez Autorkę badań.

Drugi z podjętych przez Doktorantkę celów wzbudził szczególnie zainteresowanie i uznanie recenzentki. Za szczególnie wartościowe i znaczące osiągnięcie uważam opracowanie nowych parametrów, które określają potencjał tworzenia się oporności (nowych) związków przeciwdrobnoustrojowych. Pozwalają one na wyznaczenie granicy selekcji mutantów opornych wskazując na potencjał i częstość selekcji mutantów, które mogą zdominować populację dzikich komórek patogenów *in vitro*. Można przyjąć, że zastosowanie tych parametrów pozwoli na wyznaczenie racjonalnego sposobu dawkowania, które należy stosować w leczeniu. To wpisuje się w nurt poszukiwań nowych, tak oczekiwanych, ograniczających narastanie oporności schematów terapeutycznych.

Autorka proponuje dla nowo badanych związków stosować:

- wyznaczanie wartości minimalnego stężenia, które zapobiega selekcji mutantów dominujących (MPC-D)
- określanie okna selekcji mutantów dominujących (MSW-D)
- wyznaczanie wartości minimalnego stężenia, które zapobiega selekcji mutantów o obniżonej sprawności (MPC-F)
- określanie okna selekcji tych mutantów (MSW-F)

Dla osiągnięcia wyników w tych oznaczeniach Autorka zaproponowała nową metodę rozcieńczeń w bulionie, która jej zdaniem lepiej koreluje w danymi otrzymywanymi w badaniach *in vivo*. Opracowała także nową metodę otrzymywania niezbędnego dla wykonania tych badań inokulum bakterii o gęstości $>10^{11}$ CFU/ml.

Zdaniem Autorki zastosowanie jej propozycji w badaniach przedklinicznych umożliwi typowanie do badań nowych związków przeciwbakteryjnych i badania ich w zakresach takich stężeń, których przyjęcie zasadniczo zmniejszy niebezpieczeństwo narastania oporności w czasie stosowania w leczeniu.

Praca zawiera znaczną liczbę danych, świadczących o ogromnej wiedzy Doktorantki i gruntownej znajomości problematyki podjętego tematu.

Z obowiązku recenzenta i własnej ciekawości chciałabym zadać następujące pytania.

- Wybór szczepów wzorcowych wydaje się bardzo zasadny, ale dlaczego wśród nich znalazł się szczep *Bacillus subtilis* ATCC6633 (znany jako producent lantibiotyków; szczep ten stanowił wyzwanie metodyczne, bo nie tworzył jednolitych zawiesin). Jaki był powód dołączania do grupy szczepów wzorcowych także drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*.

- Wątpliwość moją budzi zastosowanie (które spotykałam i u innych badaczy) metody krążkowo-dyfuzyjnej dla wyznaczania aktywności związków słabo rozpuszczalnych lub wytrącających się w wodzie. Jak przygotowywano takie krążki? Skąd było wiadomo jaka ilość związku (czy w ogóle) rozpuszcza się w pożywce i dyfunduje do agaru, czy takie wyniki są porównywalne i pozwalają na obiektywną ocenę?
- Z informacji podanych w pracy wiadomo, że były wykonywane badania cytotoksyczności niektórych związków. Bor jako pierwiastek nie jest toksyczny a boroorganiczne związki mają już zastosowanie w leczeniu. Czy są jednak sa znane dane dotyczące właściwości farmakologicznych i potencjalnego bezpieczeństwa tych preparatów, które badała Autorka, jaka jest szansa zastosowania ich w leczeniu?
- W takich badaniach bardzo interesujące, ale trudne do realizacji jest poszukiwanie punktów uchwytu pojedynczych związków o określonej już doświadczalnie aktywności (np. jednych pochodnych benzosiloksaboroli w stosunku do gronkowców a innych w stosunku do enterokoków). Autorka pokazuje pewne tendencje w obrębie badanych przez siebie pochodnych. Głębsze badania były prowadzone przez kooperujących badaczy z Zakładu Chemii Fizycznej Politechniki Warszawskiej oraz GPCR Drug Discovery Lab Hospital del Mar Medical Research Institute w Barcelonie. Te wyniki zostały opisane i pokazane w ostatniej publikacji (PO4). Chociaż to oczywiście nie było celem badań Doktorantki, interesują mnie ewentualne spekulacje dotyczące mechanizmu działania i relacji między potencjalnymi badanymi przez nią lekami a drobnoustrojami, względem których były aktywne. Jeśli w ogóle można takie teoretyczne rozważania przeprowadzić. Czy należy oczekiwać mechanizmów już opisanych (np. hamowanie aktywności syntetazy LeuRS) czy z jakiegoś powodu zupełnie nowych.

Podsumowanie

W badaniach Doktorantki zwraca uwagę precyzyjne zaplanowanie szerokich, złożonych schematów badań. Widać także jej ogromną wiedzę na temat aktualnego potencjału leczenia przeciwdrobnoustrojowego.

Warte zauważenia jest, że wyniki wykonywanej przez nią analizy mikrobiologicznej nowo otrzymanych w ramach tego przedsięwzięcia związków boraheterocyklicznych miały istotny wpływ na decyzje o kolejnych syntezach.

Niezwykle trudnym wyzwaniem było szczególnie opracowywanie nowych parametrów do wyznaczania wskaźników ilustrujących potencjalne tempo powstawania mutantów opornych. W pracy znalazły się nowatorskie, zweryfikowane doświadczalnie pomysły, w tym nowa metoda rozcieńczeń dla wyznaczania wartości MPC-D i MPC-F oraz metoda otrzymywania inokulum o gęstości $>10^{11}$ CFU/ml, stanowiące gotowy przepis na postępowanie w analizie nowych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Dla badań tego rodzaju szczególnie dużą wartość mają podjęte współprace pozwalające na szeroką wieloaspektową ocenę obserwowanych zjawisk. Przyniosły one istotne dane dla prowadzonych przez Doktorantkę badań. Wybór i podjęcie ich jest niewątpliwie wynikiem ogromnej sprawności naukowej i profesjonalizmu promotorki pracy prof. Agnieszki E. Laudy.

Rozprawę doktorską Pani mgr farm Joanny Krajewskiej oceniam bardzo wysoko.

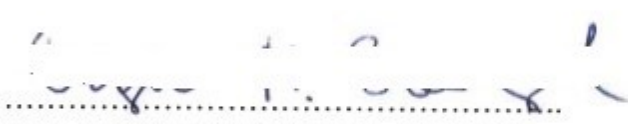
Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr farm. Joanny Krajewskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z warunkami określonymi w art.187 ust.1 i 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (dz.U.2023 poz 742).

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr farm. Joanny Krajewskiej do dalszych etapów postępowania i nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Wnoszę także o **wyróżnienie** tej rozprawy ze względu na znaczący wkład do nauki i potencjalne duże znaczenie aplikacyjne przeprowadzonych i niezwykle starannie udokumentowanych badań.

Łódź , dnia 22 marca 2024 r.


.....
Prof. dr hab.n. farm. Eligia M. Szewczyk