

Łódź, 23 listopada 2021 r.

**Recenzja**

dotycząca oceny osiągnięcia naukowego Pana dr n. farm. Daniela Szulczyka, działalności naukowo-badawczej, dorobku dydaktycznego i popularyzatorskiego oraz współpracy międzynarodowej w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauk o Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w związku z decyzją Rady Doskonałości Naukowej z dnia 21 maja 2021.

Ocenę przygotowano w oparciu o wymagania określone w art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.). Pełną dokumentację otrzymano w dniu 28.10.2021 r.

**1. Informacje o Kandydacie**

Dr n. farm. Daniel Szulczyk ukończył Wydział Chemii na Uniwersytecie Warszawskim w 2008r. uzyskując dyplom magistra chemii. Pracę magisterską wykonał w Pracowni Chemii Związków Naturalnych pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Czarnockiego. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskał w Warszawski Uniwersytecie Medycznym w 2013r. na podstawie dysertacji pt: „Zastosowanie wybranych układów heterocyklicznych do syntezy aktywnych biologicznie pochodnych tiomocznikowych”, której promotorem była prof. dr hab. Marta Struga. W okresie tym (10.2008 – 08.2013) był zatrudniony na etacie asystenta w pełnym wymiarze godzin w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej I-szego Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W 2013 roku rozwiązano Katedrę i Zakład Chemii Medycznej WUM i dr D. Szulczyk podjął pracę w firmie SciencePharma/HealthMed, następnie w Boehringer Ingelheim. W okresie 2014 – 2017 jako wolontariusz kontynuował pracę naukową na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Obecnie zatrudniony jest na pełnym etacie w firmie farmaceutycznej MSD Polska na stanowisku Market Access Manager oraz w wymiarze ½ etatu w Katedrze i Zakładzie Biochemii, Wydziału Lekarskiego WUM na stanowisku adiunkta.

**Ocena dorobku naukowego i działalności badawczej przed uzyskaniem stopnia dr n. farmaceutycznych**

Dorobek naukowy tego okresu obejmuje 5 publikacji oryginalnych, 7 komunikatów naukowych, a uzyskany IF wynosi 4.193 (74 punkty MNISW).

Habilitant na IV roku studiów (Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego) rozpoczął badania w Pracowni Chemii Związków Naturalnych pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Czarnockiego, które stały się podstawą pracy magisterskiej zatytułowanej „Zastosowanie modyfikowanych borowodorków w stereoselektywnej redukcji 1-metylo-2-aryloetylideno-1-

fenyloetyloamin". W pracy z sukcesem uzyskał [2-(3,4-dimetoksyfenilo)-1-metyloetylo]-(1-fenyloetylo)aminy i [2-(2-metoksyfenilo)-1-metyloetylo]-(1-fenyloetylo)aminy, które posłużyły następnie jako stereoselektywne odczynniki redukujące z których najlepszym okazał się borowodurek sodu modyfikowany kwasem piwalinowym wykorzystany do wykonania 12 syntez, które miały potwierdzić jego skuteczność jako stereoselektywnego odczynnika redukującego dla dimerycznych amin, będących związkami modelowymi dla syntezy amfetaminy, metamfetaminy oraz ich pochodnych. Jak określono za pomocą analizy GC-MS powstającym w przewodzie był diastereoizomer trans.

W październiku 2008 roku podjął pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej, I-szego Wydziału Lekarskiego WUM kierowanej przez prof. dr hab. Jerzego Kossakowskiego. Realizowana wówczas tematyka badawcza koncentrowała się na grupie arylopiperazyńowych pochodnych imidów, których modyfikacje służyły do poszukiwania związków o działaniu ukierunkowanym na układ nerwowy jak również na modyfikacjach syntetycznych związków heterocyklicznych (policyklicznych imidów) (Szulczyk D, Struga M. 4-Hydroxy-1-methyl-7-(propan-2-yl)-4-azatricyclo [5.2.2.0<sup>2,6</sup>]undec-8-ene-3,5-dione. Molbank, 2012; 3:1-3), jak i benzofuranów (Krawiecka M, Kuran B, Szulczyk D, Kossakowski J, Szymanek K, Młynarczyk G. Synthesis and preliminary evaluation of antimicrobial activity of selected derivatives of 2-benzofurancarboxylic acid. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DDD: Pharmacia, 2010; 23(4):11-18.) i benzotiazoli (Dobrowolski MA, Struga M, Szulczyk D. 6-Bromo-2-methylsulfanyl-1,3-benzothiazole. Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online. 2011 Dec 1;67(Pt 12):o3446-7) i tiosemikarbazonów (Mirosław B, Szulczyk D, Koziol AE, Struga M. 4-(3-Fluorophenyl)-1-(propan-2-yl-idene)thiosemicarbazone. Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online. 2011 Nov;67(Pt 11): o3010).

Wiodący temat badawczy w tym okresie realizowany przez Habilitanta dotyczył otrzymywania pochodnych tiomocznikowych o wielokierunkowej aktywności biologicznej i był podstawą do uzyskania stopnia naukowego doktora n. farm. Promotorem pracy doktorskiej była prof. dr hab. Marta Struga a część eksperymentalna została sfinansowana z grantu „Młody Naukowiec” nr. 1M8/PM11/11 WUM. Efektem tej pracy było otrzymanie 78 pochodnych tiomocznikowych 2-aminotiazolu, 3-amino-1H-1,2,4-triazolu oraz tryptaminy, z czego 55 nie zostało wcześniej opisanych w piśmiennictwie. 58 z 78 związków zostało zbadanych w kierunku aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Określono również cytotoksyczność i aktywność przeciwwirusową tych związków oraz ocenę wpływu pochodnych tiomocznikowych na ośrodkowy układ nerwowy. Wykonano również analizę strukturalną otrzymanych produktów. Pochodne z układem heterocyklicznym tiazolu, wykazały najwyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową i w większości charakteryzowały się cytotoksycznością porównywalną do przeciwtretowirusowego leku jakim jest Efavirenz. Jeden ze związków zmniejszał żywotności komórek MT-4 o połowę w stężeniu 2.4 µM co sugerowało jego aktywność przeciwnowotworową. Jedną pochodną okazała się aktywna w stosunku do wirusa HIV-1. Badania na myszach oceniających właściwości antynocyceptywne sześciu wytypowanych związków jako najbardziej aktywną wskazały pochodną 1-(2-(1H-indol-3-ilo)etylo)-3-benzylotiomocznika. Wyniki zostały upublicznione w formie publikacji o zasięgu międzynarodowym Stefanska J, Szulczyk D, Koziol AE, Mirosław B, Kedzierska E, Fidecka S, Busonera B, Sanna G, Giliberti G, La Colla P, Struga M. Disubstituted thiourea derivatives and their activity on CNS: synthesis and biological evaluation. Eur J Med Chem. 2012 Sep; 55:205-13 jak również w formie komunikatów przedstawionych na konferencjach krajowych (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7 – patrz Autoreferat).

#### **Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora**

Ten okres działalności naukowej zaowocował 13-stoma oryginalnymi publikacjami, dwoma komunikatami. Całkowity IF tych publikacji wynosi 38.470, co odpowiada 635 punktom MNISW.

W 2013 roku dr D. Szulczyk ze względu na zlikwidowanie w strukturze WUM Katedry i Zakładu Chemii Medycznej współpracuje na zasadach wolontariatu ze swoim promotorem pracy doktorskiej w ramach Centrum Badań Przedklinicznych WUM. W tym okresie zajmuje się

poszukiwaniem aktywnych biologicznie policyklicznych imidów i pochodnych tiomocznikowych. Kontynuuje współpracę z dr hab. Joanną Stefańską (Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM) oraz grupą badawczą Prof. Anny E. Koziół z Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Publikuje wyniki analizy strukturalnej otrzymanych pochodnych butyloarylopiperazynowych, tiosemikarbazynu oraz indanocyklonu (Szulczyk D, Bielenica A, Dobrowolski MA, Dobrzycki L, Krawiecka M, Kuran B, Struga M. Synthesis and structure evaluation of new complex butylarylpiperazin-1-yl derivatives. *Med Chem Res.* 2014;23(3):1519-1536; Sert Y, Mirosław B, Çırak Ç, Doğan H, Szulczyk D, Struga M. Vibrational spectroscopy (FT-IR and Laser-Raman) investigation, and computational (M06-2X and B3LYP) analysis on the structure of 4-(3-fluorophenyl)-1-(propan-2-ylidene)-thiosemicarbazone. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014 Jul 15; 128:91-9; Dobrowolski MA, Roszkowski P, Struga M, Szulczyk D. The unexpected product of Diels-Alder reaction between "indanocyclon" and maleimide. *J Mol Struct.* 2017; 1130:573-578. O6, O7, O11). Otrzymane pochodne tiazolowe oraz triazolowe wykazały aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciw biofilmowi (Stefanska J, Nowicka G, Struga M, Szulczyk D, Koziol AE, Augustynowicz-Kopec E, Napiorkowska A, Bielenica A, Filipowski W, Filipowska A, Drzewiecka A, Giliberti G, Madeddu S, Boi S, La Colla P, Sanna G. Antimicrobial and anti-biofilm activity of thiourea derivatives incorporating a 2-aminothiazole scaffold. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2015;63(3):225-36; Stefanska J, Stepień K, Bielenica A, Szulczyk D, Mirosław B, Koziol AE, Sanna G, Iuliano F, Madeddu S, Jozwiak M, Struga M. Antimicrobial and Anti-biofilm Activity of Thiourea Derivatives Bearing 3-amino-1H-1,2,4-triazole Scaffold. *Med Chem.* 2016;12(5):478-88).

Z przetestowanych 28 pochodnych tiomocznikowych tryptaminy związek 6 wykazał znaczące hamowanie Gram-dodatnich ziarniaków i miał hamujący wpływ na aktywność topoizomerazy IV *S. aureus* i aktywność super-zwijania gyrazy DNA. Związki testowano przeciwko dużemu panelowi wirusów DNA i RNA, w tym HIV-1 pod kątem cytotoksyczności i działania przeciwwirusowego. Jak wykazano pochodną 8 charakteryzowało silne, przeciwwirusowe działanie wobec typu dzikiego jak i klinicznie ważnych zmutowanych wariantów wirusa HIV-1 (Sanna G, Madeddu S, Giliberti G, Piras S, Struga M, Wrzosek M, Kubiak-Tomaszewska G, Koziol AE, Savchenko O, Lis T, Stefanska J, Tomaszewski P, Skrzycki M, Szulczyk D. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Indole-Derived Thioureas. *Molecules.* 2018 Oct 7;23(10):2554). Arylomoczniki (związki 1 i 4) oddziaływały z receptorami 5-HT1A wykazując znaczną selektywność w stosunku do badanych podtypów receptora 5-HT2 i D2 (współpraca z zespołami prof. Paolo La Colla i prof. Ferdinando Fiorino) - Szulczyk D, Bielenica A, Kędzierska E, Leśniak A, Pawłowska A, Bujalska-Zadrożny M, Saccone I, Sparaco R, Fiorino F, Savchenko O, Struga M. G protein-coupled receptor binding and pharmacological evaluation of indole-derived thiourea compounds. *Arch Pharm (Weinheim).* 2020 Feb;353(2): e1900218.

### Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe dr Daniel Szulczyk przedstawił cykl 5 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 – 2021, które zatytułował „Reakcje desulfuryzacji i cyklizacji pochodnych tiosemikarbazynu oraz tiomocznika – wpływ zmian strukturalnych na aktywność biologiczną”. Ich sumaryczny IF wynosi 20.038. Suma punktów MNiSW cyklu 410.8. Wszystkie prace stanowiące osiągnięcie naukowe są wieloautorskie. Przedstawione w osiągnięciu naukowym prace koncentrują się na projektowaniu, syntezie cyklicznych pochodnych tiosemikarbazolu i tiomocznika, badaniu ich właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej w odniesieniu do ich liniowych prekursorów. Pochodne tiosemikarbazynu oraz tiomocznika mogą być wykorzystywane jako substraty w reakcjach desulfuryzacji, a także cyklizacji, które mogą skutkować powstaniem pierścieni heterocyklicznych (oksadiazolu, triazolu, tiadiazolu) i prowadzić do syntezy szerokiego panelu nowych pochodnych i związanego z tym szerokiego spektrum bioaktywności nowo syntetyzowanych związków. Autor, kierując się danymi z piśmiennictwa ukierunkowuje swoje badania nowych pochodnych tiosemikarbazynu oraz tiomocznika na ich aktywność przeciwdrobnoustrojową sugerując, że nowe pochodne mogą być pomocne w zwalczaniu zjawiska oporności antymikrobiologicznej powstającej w wyniku selekcji mutantów naturalnie opornych w

tym także metycylino-opornych szczepów gronkowca skórno i złocistego (MRSE oraz MRSA) czy opornego na leki przeciwprątkowe *Mycobacterium tuberculosis*.

W pierwszej, punktowanej (IF = 3.098, punkty MNISW = 30) pracy oznaczonej jako H1. Szulczyk D\*, Tomaszewski P, Józwiak M, Koziol AE, Lis T, Collu D, Iuliano F, Struga M. **Synthesis and Biological Activities of Ethyl 2-(2-pyridylacetate) Derivatives Containing Thiourea, 1,2,4-triazole, Thiadiazole and Oxadiazole Moieties.** *Molecules*. 2017 Mar 6;22(3):409 Habilitant zaprojektował syntezę 36 związków bazujących na szkielecie 2-(2-pirydylooctanu) etylu, który następnie był przekształcany w tiosemikarbazydową pochodną. W wyniku reakcji cyklizacji, desulfuryzacji możliwe było uzyskanie pochodnych zawierających trzy pięciocłonowe pierścienie heterocykliczne: 1,2,4-triazolu, 1,3,4-tiadiazolu oraz 1,3,4-oksadiazolu (H1). Istotnym wydaje się wprowadzenie do pierścienia atomu chlorowca co wpływać może na lepszą rozpuszczalność związku co z kolei ułatwia przeprowadzenie badań aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Struktury związków Autor potwierdził za pomocą widm spektralnych a badania te przeprowadził w kooperacji z prof. dr hab. Anną E. Koziol z Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie oraz prof. dr hab. Tomaszem Lisem z Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktywność nowo syntetyzowanych związków określono w badaniach *in vitro* przeciwko używanym w tego typu testach standardowym szczepom bakterii gram-dodatnich, gram-ujemnych i grzybów (współpraca z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM). Niestety wszystkie analizowane pochodne nie wykazywały takiej aktywności. Pomimo niepowodzenia Autor decyduje się sprawdzić aktywność 21 z 36 związków przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności typu 1 (HIV-1) stosując efavirenz jako związek referencyjny. Ponadto, sprawdza możliwe działanie cytotoksyczne wykorzystując linię komórkowa MT-4, zainfekowaną ludzkim wirusem T-limfotropowym typu I (HTLV-I) (współpraca z prof. Paolo La Colla z Wydziału Nauk o Życiu i Środowisku, Sekcji Mikrobiologii i Wirusologii Uniwersytetu Cagliari w Monserrato we Włoszech). I w tych badaniach nie odnotowano selektywnej aktywności anty-HIV-1 jak również aktywności cytotoksycznej na hodowanych *in vitro* komórkach MT-4 (CC50 >100 µM). Opisane w pracy reakcje cyklizacji są w większości bardzo dobrze znane i szeroko stosowane to jednak elementem nowości naukowej tej pracy jest otrzymanie tożsamyh układów heterocyklicznych 1,3,4-oksadiazol-2(3H)-tionu (cyklizacja) i 1,3,4-oksadiazolu (cyklizacja i desulfuryzacja).

W dalszej części osiągnięcia Autor, chcąc zwiększyć możliwość syntezy związków o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym, zrezygnował z badań pochodnych tiosemikarbazydowych koncentrując się na uzyskiwaniu związków o zmienionym, centralnym fragmencie cząsteczki, zawierającym mniej opisywany pięciocłonowy pierścień tetrazolowy. Wyniki tych badań przedstawia w pracy Szulczyk D\*, Dobrowolski MA, Roszkowski P, Bielenica A, Stefańska J, Koliński M, Kmieciak S, Józwiak M, Wrzosek M, Olejarz W, Struga M. **Design and synthesis of novel 1H-tetrazol-5-amine based potent antimicrobial agents: DNA topoisomerase IV and gyrase affinity evaluation supported by molecular docking studies.** *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018 Aug 5; 156:631-640. Praca posiada wysoki IF = 4.833 natomiast w punktacji MNISW ma 40 pkt. Autor do wprowadzenia pierścienia tetrazolu wykorzystał 1,3-dipodstawione tiomocznikowe. Syntetyzuje 14 1,5-dwupodstawionych jego pochodnych w reakcji tiomocznika i azydku sodu w obecności chlorku rtęci (II) i trietyloaminy. Ciekawym aspektem, stanowiącym element nowości naukowej tej pracy jest zwrócenie uwagi przez Habilitanta, że małe cząsteczki oparte na tetrazolu nie były badane, zwłaszcza jako substancje przeciwdrobnoustrojowe. Zsyntetyzowane związki poddano więc ocenie *in vitro* pod kątem ich działania przeciwdrobnoustrojowego (współpraca z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM). Pochodna oznaczona numerem 11 była w stanie hamować aktywność bakteryjnej gyrazy w szczepach Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych (IC50 0,9 ± 0,1) i okazała się skuteczniejsza od związku kontrolnego cyprofloksacyny (IC50 3,5 ± 0,3) – współpraca z Zakładem Biochemii i Farmakogenomiki, Wydziału Farmacji WUM. 13 z 14 analizowanych związków wykazywało znaczną i szeroką aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do standardowych szczepów *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*). Związki 10 i 11 obok antybakteryjnej

akcji w stosunku do standardowych szczepów, okazały się również aktywne przeciwko szczepom szpitalnym *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* i *E. coli* co jest kolejnym sukcesem odnotowanym przez Habilitanta w tej pracy. Co więcej związki 10 i 11 hamowały topoizomeraę IV z *S. aureus* (związek 11 IC50  $2,6 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ ; vs.  $11,9 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$  – związek 10). W większości otrzymanych pochodnych tetrazoli (2, 3, 5, 6, 8, 9, 10 i 11), które ocenione pod kątem ich cytotoksyczności, nie wykazano takiego kierunku działania wobec komórek HaCaT i A549. Podkreślić należy, że struktury związków potwierdzono metodami spektroskopowymi ( $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$  i MS) a strukturę związku 1-(4-nitrofenylo)-N-(4H-1,2,4-triazol-4-ylo)-1H-tetrazol-5-aminy zbadano techniką krystalografii rentgenowskiej (współpraca z dr Michałem Dobrowolskim z Pracowni Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego). Ciekawym elementem prowadzonych przez dr D. Szulczyka badań było poszukiwanie relacji pomiędzy strukturą i funkcją nowosyntetizowanych związków. Doprowadziły one Habilitanta do konkluzji, że reakcja desulfuryzacji/cyklizacji 1,3-dipodstawionych tiomoczników prowadząca do otrzymania 1,5-dipodstawionych tetrazoli wiąże się ze wzrostem aktywności przeciwbakteryjnej. Interesujące okazały się również przeprowadzone w grupie 14 związków i odnośnikowej cyprofloksacyny badania dokowania molekularnego (współpraca z dr hab. S. Kmiecikiem z Laboratorium Bioinformatyki, Centrum Badań Medycznych Mossakowski oraz dr M. Kolińskim z Centrum Badań Biologiczno-Chemicznych, Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego). Zbadano ich tryb wiązania do gyrazy DNA i topoizomerazy IV, stwierdzając, że oddziałują one w miejscach, w których gyrazy i topoizomerazy wiążą się z ATP. Jak ustalono, kluczowymi w tworzeniu wiązań wodorowych okazały się Asp81 gyrazy dla związków 7 i 10, Ile51 oraz Arg144 dla cyprofloksacyny oraz Gly85 i Thr173 dla związku 11.

W kolejnej pracy wchodzącej w osiągnięcie naukowe (IF = 3.267, punkty MNiSW = 100) Szulczyk D\*, Bielenica A, Roszkowski P, Dobrowolski MA, Olejarz W, Napiórkowska M, Struga M. Cytotoxicity Evaluation of Novel bis(2-aminoethyl)amine Derivatives. *Molecules*. 2020 Jun 18;25(12):2816 dr D. Szulczyk syntetyzuje 7 nowych pochodnych bis(2-aminoetylo)aminy i określa ich cytotoksyczność w badaniach *in vitro* metodą MTT wykorzystując ludzkie, nowotworowe linie komórkowe, gruczolakoraka jelita grubego (CaCo-2), gruczolakoraka płuc (A549) i czerniaka (HTB-140) a także prawidłowe keratynocyty (HaCaT). Wybrana amina do syntezy pochodnych tiomocznikowych umożliwiała otrzymanie pochodnych o masach molowych od 508.73 do 745.41g/mol nie była do tej pory szeroko stosowana w syntezie potencjalnych leków. Zaprojektowane na tej bazie pochodne zawierające trzy fragmenty tiomocznika zostały użyte przez Habilitanta do syntezy sześciu pochodnych tiomocznikowych. Przeprowadzone kolejne reakcje desulfuryzacji oraz cyklizacji, pozwoliły dr D. Szulczykowi otrzymać związek tetrazolowy 7, udowodniając skuteczność zastosowanej metodyki syntetycznej. Po syntezie jednej pochodnej tetrazolowej możliwe było porównanie cytotoksyczności otrzymanych pochodnych tiomocznika i tetrazolu. Pochodna tiomocznikowa zawierała podstawnik 4-metoksyfenylowy, który zgodnie z obserwacjami Habilitanta okazał się przydatny w otrzymywaniu dobrej jakości kryształów. Przeprowadzone badania wykazały umiarkowaną aktywność antyproliferacyjną testowanych związków. Pochodna fenetylowa 6 charakteryzowała się najwyższą aktywnością hamującą wzrost komórek we wszystkich użytych do testowania liniach komórek nowotworowych. Wydzielanie LDH z komórek HTB-140 wahało się od 25,5% do 30,8% i dla związku 6 (pochodna fenetylowa) wykazywało najwyższy poziom odpowiedzi. Pochodna fenetylowa, jak wykazano metodą cytometrii przepływowej z użyciem Aneksyny V sprzęgniętej z FITC wpływała znacząco na indukcję procesu apoptozy w komórkach A549 jak również na indukcję wczesnej apoptozy w liniach komórkowych CaCo-2 (55,7%). Związek 4 (pochodna 4-bromofenylowa) w odniesieniu do kontroli najsilniej (prawie dziesięciokrotnie) hamował uwalnianie interleukiny-6 (IL-6). Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki Habilitant uznał pochodne bis(2-aminoetylo)aminy za obiecujące związki o działaniu przeciwnowotworowym.

Kolejnym problemem badawczym podjętym w osiągnięciu naukowym dr D. Szulczyka było poszukiwanie aktywności związków tetrazolowych przeciw prątkom gruźlicy *Mycobacterium*

*tuberculosis* Szulczyk D, Bielenica A, Głogowska A, Augustynowicz-Kopeć E, Dobrowolski M, Roszkowski P, Stępień K, Chrzanowska A, Struga M. Development of (4-methoxyphenyl)-1H-tetrazol-5-amine regioisomers as a new class of selective antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020 Jan 15; 186:111882. – praca H4 a nie H3 jak podaje Habilitant w autoreferencie posiada wysoki IF = 5.57 i dobrą punktację MNiSW = 140. Do syntezy związków wykorzystano wcześniej opisane metody z pochodnymi tiomocznikowymi jako substratami oraz reakcję desulfuryzacji połączoną z cyklizacją. Otrzymano serię dziewięciu pochodnych 1-(4-metoksyfenilo)tiomoczników, które następnie posłużyły do ich transformacji do odpowiednich pochodnych 1H-tetrazolo-5-aminy. Otrzymane pochodne tiomocznika okazały się zwartą strukturalnie grupą analogów, zawierającą terminalny pierścień fenylowy z podstawionym atomem halogenowca w pozycji orto-, meta- lub para-. Utworzenie tożsamy par tiomocznik-tetrazol (substrat-produkt), pozwoliło zbadać wpływ różnych podstawników halogenowych pierścienia fenylowego na ich właściwości przeciwbakteryjne i cytotoksyczność. Otrzymane pochodne zostały przetestowane *in vitro* pod kątem ich przeciwgruźliczego działania wobec prątków „dzikich” i atypowych. Najwyższy potencjał terapeutyczny przypisywano izomerom N-(bromofenilo)tetrazoli (pochodne 8a i 9a). Ich działanie, w stężeniach 2 µg/ml, hamowało 16-razy silniej wzrost lekoopornej formy *Mycobacterium tuberculosis* Spec. 210 w odniesieniu do leków pierwszego rzutu ryfampicyna – RMP i etambutol - EMB oraz 8 razy silniej w stosunku do izoniazydu – INH i streptomycyny - SM. Inne nowe pochodne tetrazolu były równie skuteczne wobec tego patogenu w porównaniu z uznanymi lekami. Spośród szczepów nie gruźliczych, *Mycobacterium scrofulaceum* okazał się być najbardziej podatny na obecność większości pochodnych tetrazolu. Co więcej odnotowano również efekt synergistyczny pomiędzy pochodną 9a i streptomycyną, a także addytywność pomiędzy pochodnymi 8a jak i 9a w parach z izoniazydem, ryfampicyną i etambutolem. Żadna z badanych pochodnych nie wykazała właściwości przeciwbakteryjnych w grupie prątków niegruźliczych (*M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. intracellulare*) lub działania cytotoksycznego wobec normalnych i nowotworowych linii komórkowych. Ten fakt wskazuje na wysoce selektywne działanie przeciwprątkowe badanych pochodnych.

Osiągnięcie naukowe dr D. Szulczyka zamyka praca z IF = 3.267 i punktacji MNiSW = 100: Szulczyk D\*, Bielenica A, Roszkowski P, Dobrowolski MA, Olejarz W, Kmiecik S, Podsiad M, Struga M. Synthetic Transition from Thiourea-Based Compounds to Tetrazole Derivatives: Structure and Biological Evaluation of Synthesized New N-(Furan-2-ylmethyl)-1H-tetrazol-5-amine Derivatives. *Molecules*. 2021; 26(2):323 w której zaprojektowano 12 nowych pochodnych N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-aminy, które posiadały różne podstawniki halogenofenylowe. Ich obecność skutkowała wyciąganiem z pierścienia fenylowego elektronów, zmieniając ich gęstość w obrębie fragmentu końcowego. Zaprojektowane związki zostały poddane analizie *in silico* za pomocą oprogramowania „AntiBac-Pred”, które przewiduje aktywność przeciwbakteryjną w tym także aktywność wobec szczepu *Mycobacterium tuberculosis*. Program wskazał na 3 pochodne (7,10,12) o wysokim potencjale aktywności wobec szczepu lekoopornego *Staphylococcus aureus* subsp. aureus MW2. Wszystkie pochodne dały wynik negatywny w bakteryjnym teście mutacji powrotnych (test AMES’a), co wskazuje na brak wywoływania efektu mutagennego przez badane związki. Spośród otrzymanych dwunastu pochodnych N-(furan-2-ylometrylo)-1H-tetrazolo-5-aminy związek 6 wykazywał najwyższą aktywność wobec panelu standardowych i klinicznych szczepów bakterii. W przypadku wybranych izolatów klinicznych rezultaty były lepsze niż dla referencyjnej cyprofloksacyny. Pochodna 6 działała hamująco od 8 do 16 razy silniej na dwa kliniczne szczepy *S. epidermidis* niż wzorzec. Zaobserwowano również, że pochodna 6 wykazywała przeciwko izolatowi gronkowca KR 4047 825/19 50% aktywności wywoływanej przez cyprofloksacynę. Żadna z badanych pochodnych nie była cytotoksyczna wobec prawidłowych komórek HaCaT. Żaden z 12 związków nie został rozpoznany jako kandydat do dodatkowych testów w kierunku aktywności przeciwgruźliczej. W omawianej publikacji zaproponowano również model farmakoforowy. Zidentyfikowano osiem jednostek farmakoforowych - trzy aromatyczne, trzy akceptory w pierścieniu tetrazolowym oraz dwa donory, tlen w pierścieniu furanowym i azot grupy aminowej. Podstawników fenylowych nie uznano

za jednostki farmakoforowe. Podsumowując tę część wyników należy stwierdzić, że pochodne N-(furan-2-ylometylo)-1H-tetrazol-5-amin są obiecującymi związkami pod kątem ich przeciwdrobnoustrojowego działania.

O znaczeniu przedstawionych w osiągnięciu naukowym badań dr D. Szulczyka świadczą również poniższe zgłoszenia patentowe, jedno o zasięgu krajowym i jedno o zasięgu międzynarodowym.

- Zgłoszenie wynalazku w Urzędzie Patentowym RP „Nowe pochodne 5-aminotetrazolu o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym”, Numer zgłoszenia: P. 422741
- Zgłoszenie międzynarodowe PCT wynalazku „New 5-aminotetrazole derivatives with antibacterial and antifungal activity” Numer zgłoszenia: PCT/PL2018/050047

Habilitant we wszystkich pracach stanowiących osiągnięcie naukowe jest pierwszym autorem a w 4 z nich autorem korespondującym i jak wynika ze złożonych oświadczeń współautorów badaczem wiodącym, który tworzył koncepcję prac, plany badań, syntetyzował związki, a także opracowywał wyniki.

#### **Współpraca naukowa**

Prowadzone przez dr D. Szulczyka badania naukowe mają charakter multidyscyplinarny, co niewątpliwie wymagało nawiązania wieloosrodkowych kooperacji i umiejętności koordynowania badań. Wśród kooperantów afiliowanych w publikacjach znajduje się szereg pracowników nauki z ośrodków krajowych (WUM - Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Zakład Biochemii i Farmakogenomiki; UW Wydział Chemii - Pracownia Krystalografii, Pracownia Chemii Związków Naturalnych, Pracownia Teorii Biopolimerów; Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie Wydział Chemii Zakład Krystalografii; UM w Lublinie Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakogenomiką; Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN; Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie; Instytut Fizyki PAN w Warszawie) jak również z ośrodków zagranicznych (Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università degli Studi di Cagliari, Monserrato, Włochy; Dipartimento di Farmacia Università di Napoli “Federico II”, Neapol, Włochy).

Habilitant legitymuje się jednym, krótkoterminowym stażem naukowym, który odbył w sierpniu 2019r. w ośrodku krajowym (Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie).

#### **Udział w projektach badawczych**

Jedynym finansowaniem jakie uzyskał Dr D. Szulczyk na swoje badania był grant „Młody Naukowiec” nr. 1M8/PM11/11 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, który realizował w latach 2011 - 2013.

#### **Recenzje prac**

Habilitant był proszony o przygotowanie recenzji prac oryginalnych złożonych do druku dla prestiżowych czasopism o zasięgu międzynarodowym European Journal of Medicinal Chemistry (3), Pharmaceuticals (3), Crystals (1), Antibiotics (2), Molecules (4).

#### **Nagrody za działalność naukową**

Dr D. Szulczyk trzykrotnie (2013, 2019 i 2020) uzyskał Nagrodę Naukową JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

#### **Działalność dydaktyczna**

Związana była z zatrudnieniem w październiku 2008 na etacie asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej I-szego Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Prowadził zajęcia laboratoryjne, seminaria i wykłady z Chemii Medycznej dla studentów I roku English Division jak również studentów I roku I i II Wydziału Lekarskiego oraz Wydziału

Lekarsko-Dentystycznego. Od 2018 r prowadzi zajęcia z Biochemii z elementami chemii dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego oraz Wydziału Lekarsko-Dentystycznego.

#### **Działalność organizacyjna**

W 2013 roku wszedł w skład Komisji Rekrutacyjnej WUM.

#### **Podsumowanie i wniosek końcowy**

Dorobek naukowy dr D. Szulczyka przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora obejmuje 3 publikacje w czasopismach posiadających IF (łącznie 4,193 i punktacji MNiSW 65) oraz 2 prace bez IF z 9 pkt. MNiSW (łącznie 74 pkt MNiSW).

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora 13 prac posiadających IF łącznie 38,470 i punktacji MNiSW 635. Spośród 18 prac w 10 dr D. Szulczyk był pierwszym autorem lub autorem korespondencyjnym. Ponadto, jest współautorem 9 streszczeń przedstawianych na konferencjach naukowych. Porównując punktację w okresie przed i po uzyskaniu stopnia naukowego doktora należy odnotować ponad 9-krotny jej wzrost.

IF całkowitego dorobku naukowego Habilitanta wynosi 42,663 i w punktacji MNiSW 709. Liczba cytowań (bez autocytowań wg. bazy Web of Science wynosi 126, a wg. bazy Scopus 130. Index Hirscha 8.

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr Daniela Szulczyka należy podkreślić spójność wyselekcjonowanych prac, Jego rolę lidera w tworzenie koncepcji przedstawionych do recenzji prac. Zaprezentowane w osiągnięciu wyniki wnoszą nowe elementy w rozwój badań związanych z projektowaniem i syntezą serii pochodnych tiosemikarbazydu opartą o trzy pierścienie heterocykliczne (1,2,4-triazolu, 1,3,4-tiadiazolu i 1,3,4-oksadiazolu); związków tiomocznikowych oraz przekształcenie ich do pochodnych tetrazolowych za pomocą reakcji desulfuryzacji połączonej z cyklizacją; syntezą pochodnych N-(furan-2-ylometylo)-1H-tetrazolo-5-aminy i serii tiomocznikowych pochodnych bis(2-aminoetylo)aminy. Habilitant udowodnił, że w celu rozwiązania problemu naukowego potrafi nawiązywać kooperacje naukowe i prowadzić badania wielotorowo z zespołami zajmującymi się badaniami krystalograficznymi dzięki którym Habilitant wyjaśnia różnice strukturalne między uzyskiwanymi pochodnymi (tiomocznikowymi a tetrazolowymi) oraz pomiędzy otrzymanymi formami izomerycznymi (regioizomerami) związków tetrazolowych. W celu określenia aktywności biologicznej syntetyzowanych związków opisaną zależność pomiędzy zmianą struktury a ich aktywnością biologiczną nawiązuje kooperacje z zespołami mikrobiologów, biochemików a nawet wirusologów. Szeroko zakrojone badania pozwalają na wyjaśnienie mechanizmu działania przeciwbakteryjnego badanych związków, opracowanie modelu farmakoforowego ich oddziaływania z bakteryjną gyrazą DNA. Warte podkreślenia jest otrzymanie regioizomerów 1H-tetrazolo-5-aminy o wysokiej aktywności przeciwgruźliczej, silniejszej od referencyjnej ryfampicyny i etambutolu oraz izoniazydu i streptomycyny.

Mam nadzieję, że stosunkowo skromna działalność organizacyjna dr D. Szulczyka jak również aktywność w pozyskiwaniu funduszy na prowadzone badania naukowe zostaną zintensyfikowane w dalszej Jego działalności zawodowej.

Oceniana rozprawa habilitacyjna, dorobek naukowy spełniają kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przedkładam zatem wniosek Komisji Habilitacyjnej powołanej przez Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie dr n. farm. Daniela Szulczyka do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego, w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

**KIEROWNIK**  
Zakładu Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
  
Prof. dr hab. n. farm. Marek Mirowski