



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Recenzja Rozprawy Doktorskiej p. mgr Dawida Maliszewskiego pt. "Synthesis and investigation of biological activities of the new 1,3,5-triazine derivatives"

Informacje wstępne

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska pana mgr Dawida Maliszewskiego została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku oraz w Zakładzie Biologii Eskisehir Technical University w Turcji pod kierunkiem Promotorów - p. dr hab. Danuty Drozdowskiej oraz p. prof. dr. Rasime Demirel.

Dysertacja została przygotowana w sposób tradycyjny, zaś uzupełnieniem podstaw teoretycznych przedstawionych w jej wstępie, jest praca pogładowa pierwszego autorstwa Doktoranta, wydana w prestiżowym czasopiśmie JCR - *Pharmaceuticals*. Ponadto p. mgr Maliszewski jest pierwszym Autorem pracy oryginalnej wydanej w czasopiśmie JCR- *Molecules* i współautorem trzech innych, co przekłada się na łączny współczynnik oddziaływania $IF > 21$ ($MNI_{SW} = 550$). Na swoim koncie ma również 12 zgłoszeń zjazdowych, w tym 4 na konferencjach zagranicznych. Brał udział w 3 polskich projektach badawczych, gdzie pełnił rolę kierownika w dwóch: projekcie uczelnianym - „Synteza i badanie właściwości biologicznych nowych pochodnych s-triazynowych, jako pochodnych wielocelowych środków przeciwnowotworowych” oraz projekcie pt. „Badanie właściwości przeciwmikrobiologicznych nowych pochodnych s-triazyny” w ramach Międzynarodowych Studiów Doktoranckich.

Już na wstępie chciałabym, zatem, pochwalić wszechstronną aktywność naukową Doktoranta, która z punktu formalnego w pełni upoważnia Go do ubiegania się o stopień doktora.

Charakterystyka strony naukowej i redakcyjnej Dysertacji

Głównym przedmiotem rozważań podjętych w Dysertacji jest synteza i ocena aktywności biologicznej związków zawierających rdzeń 1,3,5-triazyny (czyli s-triazyny) w poszukiwaniu nowego leku, z uwzględnieniem trzech ważnych kierunków terapeutycznych skierowanych odpowiednio na: infekcje o podłożu mikrobiologicznym,

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

nowotwory i choroby neurodegeneracyjne - w szczególności chorobę Alzheimera. Zasadność wyboru takiego kierunku badań w dyscyplinie nauk farmaceutycznych jest niepodważalna zarówno w świetle największych wyzwań współczesnego leczenia, jak i aktualnego stanu rynku farmaceutycznego, zaś dodatkowym argumentem jest tu szeroki wachlarz aktywności biologicznej i wciąż niewyczerpane możliwości dalszych farmakomodulacji w grupie pochodnych 1,3,5-triazyny. Doktorant przedstawia esencję takiej argumentacji w swoim 16-stronicowym wstępie, analizując osiągnięcia światowych badań chemii medycznej nad pochodnymi 1,3,5-triazyny reprezentującymi nadmienione trzy kierunki działań farmakologicznych, z uwzględnieniem leków dostępnych na rynku farmaceutycznym, a także tych w fazie poszukiwań. Obok charakterystyki farmakologicznej rozważanej grupy chemicznej, przemyślił metody ich syntezy odwołując się również do szerszych danych na ten temat, zawartych w pracy przeglądowej jego pierwszego autorstwa, którą załączył na końcu dysertacji. W swoim słowie wstępnym zaakcentował również znaczenie wprowadzania do układu triazyny podstawienia oligopeptydowego, tym samym uzasadniając podjęty w swojej dysertacji kierunek modyfikacji chemicznych.

Głównym obszarem prac badawczych opisanych w dysertacji jest synteza chemiczna pochodnych s-triazyny, podstawionych zarówno zróżnicowanym fragmentem dipeptydowym, jak i piperazyną z terminalnym ugrupowaniem chloroetylowym, warunkującym działania alkilujące przydatne dla pożądanej aktywności cytotoksycznej przeciw komórkom nowotworowym, bakteryjnym czy grzybiczym. Otrzymane związki zostały następnie przebadane w rozbudowanym skryningu biologicznym *in vitro*, w celu oceny działań przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwnowotworowych oraz hamujących enzymy zaangażowane w patofizjologię choroby Alzheimera. Testy objęły również ocenę potencjalnych mechanizmów na poziomie molekularnym – w szczególności badania eksperymentalne i wspomaganą komputerowo teoretyczną ocenę wpływu tej grupy związków na gyrazy A i B.

Mimo, że eksperymentalne prace chemiczne dotyczyły syntezy tylko 8 związków finalnych, na duży aplauz zasługuje ich wysoki poziom

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

chemiczny. Zakres prac obejmował ambitne kilkietapowe syntezy, poprzedzone otrzymywaniem stosownych półproduktów dipeptydowych - z wykorzystaniem rozmaitych metod protekcji i deprotekcji, czy substytucji chloru przy pierścieniu triazyny - reakcji niełatwych do monitorowania, a także wymagających dużych umiejętności analitycznych dla interpretacji widm spektralnych w celu oceny czystości i tożsamości otrzymywanych struktur.

Ponadto doświadczenie Doktoranta w prowadzeniu wszechstronnego skryningu biologicznego, obejmującego: eksperymentalne testy mikrobiologiczne i badania *in vitro* mechanizmów molekularnych na poziomie komórkowym, a także modelowanie molekularne z uwzględnieniem optymalizacji struktur krystalograficznych celów białkowych (gyraz) dostępnych w PDB, trafnego określenia ich kieszeni wiążącej oraz przeprowadzenia symulacji dokowania z poprawną oceną korzystnych stanów energetycznych, z naddatkiem spełnia wymagania stawiane osobie ubiegającej się o stopień doktora nauk farmaceutycznych.

Na moje duże uznanie zasługuje, zatem, wszechstronny warsztat narzędzi badawczych, które opanował p. mgr Maliszewski w czasie studiów doktoranckich, doliczając do tego jeszcze umiejętność opracowywania i publikowania wyników, o czym świadczy jego pierwsze autorstwo w dwóch artykułach naukowych na łamach renomowanych czasopism MDPI.

Niewątpliwymi osiągnięciami naukowymi doktoratu, wpisującymi się w światowe badania chemii organicznej i farmaceutycznej, jest opracowanie i skuteczne przeprowadzenie syntezy 8 nowych peptydowych pochodnych s-triazyny, które okazały się aktywnymi inhibitorami gyrazy w walce z lekoopornymi drobnoustrojami, a także związkami proapoptotycznymi w komórkach raka piersi - przydatnymi dla potencjalnych terapii nowotworowych, wykazując również umiarkowaną aktywność inhibitora AChE i BACE1 – obiecującą dla innowacyjnych podejść w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Oparta o uzyskane wyniki jakościowa analiza zależności struktura-aktywność umożliwia wytypowanie najaktywniejszych związków - adekwatnie do przeprowadzonych testów biologicznych, jako nowych struktur wiodących dla rozwoju poszukiwań leku o silniejszym

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

i doprecyzowanym kierunku działania farmakologicznego, co wnosi istotną „cegiełkę” w rozwój polskich i światowych nauk farmaceutycznych.

Wysoko, zatem oceniam walory naukowe tej dysertacji oraz jej wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych.

Praca łącznie liczy 98 stron, na które składa się trzynaście rozdziałów, w tym 8 głównych oraz 5 dodatkowych stanowiących listy i załączniki. Rozdziały główne rozpoczyna 16-stronicowy wstęp (*Introduction*), następnie rozdział *Aims and scope* ukazuje cel i zakres przeprowadzonych zadań badawczych. Rozdział *Materials and Methods* przedstawia szczegóły eksperymentalne przeprowadzonych badań, których wyniki zostały zebrane w kolejnym rozdziale *Results*, a dodatkowo przedyskutowane w następującym po nim rozdziale *Discussion*, zaś płynące z nich wnioski zebrano w postaci dziewięciu punktów w podsumowującym rozdziale *Conclusions*. Doktorant odwołał się do 108 pozycji literaturowych w większości z czasopism JCR opublikowanych w ostatnim dwudziestoleciu. Dysertację cechuje przejrzystość opisów wsparta elegancką szatą graficzną, skomponowaną z 5 rysunków, 18 schematów i 9 tabel, gdzie szczególne wrażenie estetyczne robią trafnie dobrane ryciny dotyczące wyników modelowania cząsteczkowego.

Pytania i uwagi krytyczne

1. Z pewną dozą krytyki muszę, natomiast, się odnieść do Schematu nr 13 (str. 24), do którego brak odwołania w oplatających go opisach, a i lakoniczny podpis wymaga dużej intuicji od czytelnika, żeby zrozumiał jego przesłanie i rolę w niniejszej dysertacji. Prosiłabym, żeby Doktorant przybliżył mi to w czasie obrony.
2. Kolejną niejasność stanowią dla mnie badania aktywności biologicznej dla grupy s-triazyn opisanej przez p. Frączyk i współpracowników w 2016 roku. Na str. 42 napisano:

“The antimicrobial activity of all the compounds was tested *in vitro* on pathogenic bacteria, yeast, and filamentous fungi [...] and compared with 11 s-triazine derivatives (Table 2) described by Frączyk et al. [80]”.

Z dalszego kontekstu wynika jednak, że grupa tych 11 związków nie stanowi porównania, a raczej rozszerzenie badanej serii (**4a-4h**) – testowane i analizowane pod względem wyników w równocenny

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



sposób. Co, zatem, zdecydowało, że ta seria znalazła się w dysertacji? Czy przeprowadzenie skrinnigu biologicznego dla związków **5a-7c** było przedmiotem badań własnych Doktoranta?

W dysertacji brakuje wzmianki na ten temat i w ogóle brak informacji, które prace eksperymentalne i teoretyczne stanowiły przedmiot badań własnych Doktoranta, w których brał udział częściowo, a które w całości przeprowadzili Współpracownicy (i kto to był z nazwiska). Brak jakichkolwiek podziękowań mógłby świadczyć, że wszystkie badania były wyłącznie przedmiotem wysiłków Doktoranta. Czy tak było w istocie? Proszę, żeby Doktorant wyjaśnił mi te kwestie w czasie obrony.

3. Do dysertacji wkradły się też następujące nieścisłości merytoryczne, na które Doktorant powinien zwrócić uwagę przy dalszych opracowaniach wyników do publikacji i prezentacji:

3.1. Brak wzmianki o szczepie *M. luteus* (NRRL B-4375) w rozdziale „Materials and methods”, a wyniki pojawiają się w „Results”

3.2. Str. 43 i 44 – Niespójność opisu wyników działania związków na gyrazę *E.coli*, czyli:

“In turn, substances **4c**, **4d** and **7b** (100 nM) and **4a**, **4d**, **4e**, **6f** and **6c** (300 nM) inhibited *E. coli* gyrase action on supercoiled kDNA (Figure 2)” (w pierwszej części opisu),

a następnie (pod koniec strony):

“Triazine analogues: **4a**, **4e** and **6c** not inhibited *E. coli* gyrase at neither concentration”

Praca napisana jest poprawną angielszczyzną, znalazłam w niej tylko drobne i nieliczne uchybienia interpunkcyjne i tzw. „literówki”, np.:

- str. 9 - jest „ChemSpaider”, a powinno być „ChemSpider”

- str. 17 i str. 18 - błędy w pisaniu nazwy używanych szczepów:

S. Aureus (również na str. 32)

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*

Candida albicans, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus niger*

A. Baumannii

C. Neoformans

Zgodnie z zasadami systematyki (taksonomia Linneusza), nazwy szczepów wymagają pisania kursywą: z dużej litery nazwa rodzaju (genus), a z małej nazwa gatunku (species), o czym Doktorant pamiętał na innych stronach dysertacji.

- str. 21 - jest „Lorak et al.”, a powinno być „Lolak et al.”

- str. 21 – “Maqbool et al. designed and synthesized derivative **20**” powinno być “Maqbool et al. designed and synthesized derivative **21**”.

- str. 43 “Triazine analogues: **4a**, **4e** and **6c** not inhibited *E. coli* gyrase” (brak “did”)

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Podsumowanie

Wymienione drobne niedostatki nie umniejszają jednak mojej ogólnie wysokiej oceny dla przedstawionej mi do recenzji dysertacji. Doktorat reprezentuje wysoki poziom interdyscyplinarnych badań z obszarów: chemii organicznej, mikrobiologii, farmakologii, biologii molekularnej i modelowania cząsteczkowego - wpisujących się w szeroko rozumiane nauki farmaceutyczne.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie pana mgr Dawida Maliszewskiego do finalnych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 16 listopada 2022

Katedra i Zakład Technologii
i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM

prof. dr hab. inż. Jadwiga Handzlik
kierownik

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl