



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII OGÓLNEJ I PARAZYTOLOGII

Warszawa, 20 maja 2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Adriana Zdzisława Bekiera
pod tytułem
„Identyfikacja celu molekularnego u *Toxoplasma gondii* dla pochodnych
tiosemikarbazydu oraz ocena ich wpływu na przebieg toksoplazmozy”

Podstawą do sporządzenia niniejszej recenzji jest pismo prof. dr hab. Agnieszki Morczak Przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, z dnia 26 kwietnia 2022r.

Przestawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Adriana Zdzisława Bekiera została przygotowana w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dwóch promoterek Pani dr hab. n. biol. Katarzyny Dzitko, prof. UŁ z Katedry Mikrobiologii Molekularnej Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ oraz prof. dr hab. n. farm. Agaty Paneth z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Biorąc pod uwagę tematykę rozprawy opieka dwóch Pań promotor jest uzasadniona i nie budzi wątpliwości.

Rozprawa doktorska mgr Adriana Zdzisława Bekiera składa się z jednej złożonej do druku i dwóch opublikowanych oryginalnych publikacji, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Badania realizowane były w ramach trzech projektów badawczych tj.: (1) projektu Preludium 16 (2018/31/N/NZ6/03004) Narodowego Centrum Nauki „Właściwości

przeciwpasożytnicze oraz identyfikacja molekularnych tarcz docelowych nowych pochodnych tiosemikarbazydu i tiazolidynonu w inwazjach o etiologii *Toxoplasma gondii*; (2) dotacji celowej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na projekt „Pochodne tiosemikarbazydu i tiazolidynonu jako nowe inhibitory hydrolazy tyrozynowej”; oraz (3) projektu MNiSW w ramach Inkubatora Innowacyjności 4.0 „Nowe pochodne tiosemikarbazydu i tiazolidynonu w inwazjach o etiologii *Toxoplasma gondii* w badaniach in vivo” POIR.04.04.00-00-0004/15; /2020/357/DIR; W_13_UL. Warto podkreślić, że doktorant był kierownikiem wszystkich powyższych projektów badawczych wykonywanych pod opieką naukową Pani Profesor Katarzyny Dzitko. Wykazał się on skutecznością w zdobywaniu funduszy zewnętrznych na prowadzenie badań niezależnych od ograniczonego finansowania statutowego. Przygotowanie wniosku grantowego i otrzymanie finansowania zasługuje na podkreślenie, szczególnie że proces ten jest długotrwały, a współczynnik sukcesu bywa niewielki. Świadczy to również o docenieniu podjętej tematyki badawczej przez niezależnych ekspertów i recenzentów powoływanych przez instytucje grantowe.

Dodatkowo, jak wynika z przesłanej mi do oceny rozprawy, doktorant wykonywał swoje analizy we współpracy z badaczami z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie; Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi; Katedry Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego; Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Łódzkiej oraz Zakładu Histologii i Embriologii Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Tak liczna i owocna współpraca również zasługuje na zauważenie.

Wyniki dysertacji mgr Adriana Zdzisława Bekiera zostały przedstawione w następujących oryginalnych artykułach naukowych:

- *4-Arylthiosemicarbazide derivatives as a new class of tyrosinase inhibitors and anti-Toxoplasma gondii agents. Adrian Bekier, Lidia Węglińska, Agata Paneth, Piotr Paneth and Katarzyna Dzitko. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2021; 36:1, 1145-1164.*

IF₂₀₂₁ = 5.051; IF_{5-letni} = 4.598; pkt. MEiN = 140

- *4-Arylthiosemicarbazide derivatives as a toxoplasmic aromatic amino acid hydroxylase inhibitors and anti-inflammatory agents. Adrian Bekier, Anna Brzostek, Agata Paneth, Bożena Dziadek, Jarosław Dziadek, Justyna Gatkowska and Katarzyna Dzitko. International Journal of Molecular Science, 2022; 23(6), 3213.
IF₂₀₂₁ = 5.924; IF_{5-letni} = 6.132; pkt. MEiN = 140
Manuskrypt przyjęty do recenzji:*
- *4-Arylthiosemicarbazide derivatives – pharmacokinetics, toxicity and anti-Toxoplasma gondii activity in vivo. Adrian Bekier, Justyna Gatkowska, Maciej Chyb, Justyna Sokołowska, Grażyna Chwatko, Rafał Głowacki, Agata Paneth and Katarzyna Dzitko. Praca złożona do czasopisma: European Journal of Medicinal Chemistry.
IF₂₀₂₁ = 6.514; IF_{5-letni} = 6.099; pkt. MEiN = 140.*

Powyższe tytuły należą do czasopism o wysokim, jak dla reprezentowanej przez doktoranta dziedziny badań, współczynniku oddziaływania (IF). Świadczy to ich przynależności do grupy wiodących periodyków w dyscyplinie. Dodatkowo wyniki rozprawy doktorskiej były prezentowane przez Doktoranta na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, zarówno w formie prezentacji ustnych, jak i posterów.

Doktorant jest także współautorem 10 publikacji naukowych i 10 patentów/zgłoszeń. Wynik ten, szczególnie dotyczący patentów, jest jak na doktoranta imponujący. Sądząc po tytułach przedstawionych w spisie zgłoszeń patentowych część z nich mogłaby z powodzeniem uzupełnić bezpośredni dorobek mgr Bekiera składający się na jego rozprawę.

Na podstawie przygotowanej rozprawy mgr Adrian Bekier aplikuje o stopień doktora w dyscyplinie nauk biologicznych. W poniższej recenzji skupiłem się na kryteriach oceny dostosowanych do wymagań stawianych tym właśnie rozprawom doktorskim.

Postawiona przez doktoranta hipoteza badawcza zakładała, że pochodne 4-arylotiosemikarbazynu mogą efektywnie hamować namnażanie *T. gondii* poprzez hamowanie swoistych szlaków metabolicznych pierwotniaka oraz przekraczać barierę krew-mózg i przenikać przez błonę komórkową, zwiększając tym samym skuteczność ich działania w toksoplazmozie.

Głównym celem badań była natomiast identyfikacja molekularnych tarcz docelowych dla wstępnie wytypowanych w badaniach *in vitro* pochodnych 4-arylotiosemikarbazynu charakteryzujących się wysoką efektywnością wobec tachyzoitów *T. gondii* i niską

cytotoksycznością wobec zasiedlanych przez pierwotniaka komórek, a następnie ocena tych związków *in vivo*.

Wybrany temat rozprawy uważam za uzasadniony. Analizując dane dostępne w bazach bibliometrycznych łatwo dojść do wniosku, że zagadnienie toksoplazmozy wciąż pozostaje aktualne. Zarażenie *T. gondii* jest jedną z najczęstszych pasożytoz człowieka na świecie. Odsetek osób seropozytywnych wynosi od 5% do ok 70%, a w populacji polskiej odsetek ten waha się między ok. 36,0% do ok 63%. W cyklu życiowym tego pasożyta niezbędnym ogniwem są żywicieli ostateczni, którymi są koty i kotowate. Jednak to nie kontakt z kotem jest najczęstszym źródłem zarażenia. Zwykle jest nim spożycie niedogotowanego bądź surowego mięsa skażonego bradyzoitami tego pierwotniaka. U osób zdrowych toksoplazmoza może wywoływać objawy grypopodobne, jednak w większości przypadków przebiega pozornie bezobjawowo. Może ona jednak powodować poważne konsekwencje zdrowotne w przypadku niemowląt urodzonych przez zarażone matki i u pacjentów z deficytami immunologicznymi. Dodatkowo coraz więcej doniesień sugeruje korelacje pomiędzy występowaniem teoretycznie bezobjawowej toksoplazmozy, a chorobami psychicznymi (choroba dwubiegunowa, schizofrenia, autoagresja itd.), podejmowaniem zachowań ryzykownych i popełnianiem samobójstw. W związku z tym pasożyt ten może prawdopodobnie wpływać bezpośrednio również na stan potencjalnie zdrowych i bezobjawowych nosicieli. Konsekwencje społeczne i zdrowotne takiej „bezobjawowej” toksoplazmozy mogą być poważniejsze niż wcześniej sądzono. Skuteczność zwalczania farmakologicznego *T. gondii* znajdujących się cystach tkankowych jest żadna lub niewielka, dlatego też niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych, skutecznych farmaceutyków mogących przekraczać barierę krew mózg, internalizować do zajętych przez pasożyta komórek, a przy tym nie wykazywać efektu cyto- i neurotoksycznego. Jednocześnie leki takie nie powinny kumulować się w narządach oraz nie mogą być nefro- i hepatotoksyczne. Nadmiar tych związków powinien być też łatwo usuwany z organizmu pacjenta. Wyniki przeprowadzonych przez mgr Adriana Bekiera wpisują się w ten trend i niosą pewną nadzieję na nowe skuteczne terapeutyki stosowane w toksoplazmozie, szczególnie jej postaci mózgowej.

Rozprawa doktorska mgr Adriana Bekiera liczy 127 numerowanych stron, w tym kopie artykułów naukowych, w których zawarte są wyniki badań przeprowadzonych doktoranta oraz oświadczenia współautorów. Jej układ jest dosyć oryginalny i nietypowy. Dysertacja rozpoczyna się od wymienienia źródeł finansowania oraz współpracy i publikacji wchodzących

w cykl doktoratu. Moim zdaniem informacje te można było umieścić na nienumerowanych stronach przed „Spisem treści”. Warto było je natomiast zastąpić streszczeniem rozprawy, umieszczając je na początku, co w mojej ocenie bardziej odpowiada układowi publikacji naukowej. Uwaga ta ma jedynie charakter organizacyjny i edytorski, nie wykluczam że zastosowana przez Doktoranta konstrukcja rozprawy została przyjęta na Uniwersytecie Łódzkim. W streszczeniu (str. 31-32) przygotowanym w języku polskim oraz angielskim Doktorant w syntetyczny sposób przedstawia główne założenia i wyniki przeprowadzonych badań. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mógłby się znaleźć po metodyce badań i przed omówieniem uzyskanych wyników.

Bibliografia liczy 85 pozycji, w tym oryginalne publikacje Doktoranta i te z jego współautorstwem. W moim odczuciu cytowana literatura również powinna znaleźć się w innym miejscu rozprawy i być zakończeniem części teoretycznej i omówienia wyników. W rozprawie mgr Bekiera bibliografia umieszczona została po przedstawieniu dorobku naukowego doktoranta, a przecież się do jego dorobku nie odnosi. Sam dorobek naukowy, choć ważny, nie jest rozprawą dokorską *per se* i stanowi informację dodatkową. Zatem podsumowanie działalności naukowej i organizacyjnej powinno się znaleźć na końcu, po załączonych kopiach artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. W tym miejscu pozwolę sobie również na uwagę, że działalność organizacyjna nie jest dorobkiem naukowym. Działalnością naukową nie jest też organizowanie konferencji itd., gdyż jest to działalność organizacyjna. Działalność naukowa obejmuje badania naukowe, prace rozwojowe oraz twórczość artystyczną.

W dalszej części załączone zostały kopie artykułów wchodzących w cykl publikacji i oświadczeniami współautorów i wskazujące na przeważający wkład Doktoranta.

Część merytoryczną rozpoczyna wprowadzenie, które jest konsekwentne, spójne i odnosi się do najważniejszych pozycji literaturowych. Doktorant nie uniknął tu drobnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Część tę uzupełniają odpowiednio dobrane ilustracje.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam kilka drobnych uwag do tej części rozprawy. Doktorant wymienia grupy systematyczne pasożytów z typu Apicomplexa, jednak należą tu także Gregaryny, Sarcocystis i Neospora o czym Doktorant nie wspomina. Straty ekonomiczne są związane nie tylko ze skutkami zgonów ludzi i strat w gospodarstwach, ale przede wszystkim z konsekwencjami społecznymi. Objawowe zachorowanie na ww. pasożyty i konieczność hospitalizacji powoduje obciążenia dla ochrony zdrowia, niezdolność do pracy, czasowe

wykluczenie z życia społecznego, powikłania zdrowotne. Warto też uzupełnić, że zachorowania i straty dotyczą nie tylko, jak podaje doktorant do zwierząt gospodarskich, ale dotyczą również zwierząt dziko żyjących i wpływają na gospodarkę ich populacjami.

Doktorant wspomina, że żywicielami *T. gondii* są zwierzęta stałocieplne cyt. „U żywicieli pośrednich, którymi są pozostałe zwierzęta stałocieplne...” (Str. 11). Jednak badania dowodzą, że mogą być nimi również zwierzęta zmiennocieplne np. gady, a skorupiaki i mięczaki mogą stanowić źródło zarażenia.

Ponieważ Doktorant skupia się we wprowadzeniu głównie na znaczeniu toksoplazmozy w medycynie człowieka, to warto było wspomnieć o jej postaciach klinicznych.

W dalszych częściach rozprawy mgr Adrian Bakier przedstawia cel pracy i hipotezę badawczą, a następnie przechodzi do przedstawienia metodyki badań. Z punktu widzenia recenzenta ułatwieniem byłoby zebranie w jednym miejscu i bardziej szczegółowe opisanie zastosowanych metod badawczych. Zapoznanie się z nimi w trzech różnych artykułach, jest kłopotliwe. Niezależnie od powyższego, metody zostały dobrane i zastosowane prawidłowo, a różnorodność zastosowanych technik i narzędzi eksperymentalnych świadczy o bardzo dobrym i urozmaiconym warsztacie Doktoranta.

W prezentowanych artykułach Doktorant w sposób logiczny i spójny odpowiada na postawione w rozprawie hipotezy i realizuje zdefiniowane cele. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki zostały dodatkowo przedstawione na bardzo dobrze opracowanych i przemyślanych rycinach.

Moim zdaniem za najważniejsze wyniki zaprezentowane w rozprawie należy uznać: (1) wskazanie enzymów odpowiedzialne za przemianę aminokwasów aromatycznych (Tyr, Phe i Trp) jako potencjalnych celów molekularnych dla pochodnych 4-arylotiosemikarbazylu. (2) Potwierdzenie zahamowania aktywności otrzymanych w systemie ekspresyjnym *Escherichia coli* rekombinowanych białek AAH1 i AAH2 przez dwie pochodne 4-arylotiosemikarbazylu z podstawnikiem 4-nitrofenylowym (2a) lub 3-jodofenylowym (6a). Przeprowadzenie badań *in vivo* badań toksyczności, przy maksymalnej dawce tolerowalnej 1000 mg/kg m.c. i stwierdzenie, że zastosowana terapia nie spowodowała istotnego wzrostu poziomu enzymów wątrobowych czy kreatyniny, a analiza farmakokinetyczna wyselekcjonowanych pochodnych potwierdziła, że związki te przedostają się do układu krążenia i przechodzą barierę krew-mózg. (3) Wskazanie, że pochodne 2a oraz 6a wykazały istotną aktywność przeciwpasożytniczą poprzez eliminację tachyzoitów szczepu RH *T. gondii* podczas ostrej toksoplazmozy u

zarazonych myszy oraz redukcję cyst tkankowych szczepu DX *T. gondii* w mózgu, sercu oraz mięśniach.

Ponadto badania Doktoranta po raz pierwszy wykazały mechanizm działania pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu na pierwotniaka *T. gondii* i wskazały, które z nich mają największy potencjał w dalszych badaniach przedklinicznych.

Przeprowadzone przez Doktoranta analizy pozwoliły mu sformułować dziesięć wniosków, z których za najważniejsze uważam stwierdzenie, że:

- przeprowadzone badania enzymatyczne oraz zastosowanie testu powinowactwa związku do białka potwierdziło zahamowanie aktywności rekombinowanych hydroksylaz aminokwasów aromatycznych: AAH1 i AAH2 *T. gondii* przez pochodne 4-arylotiosemikarbazydu 2a oraz 6a. Typ hamowania inhibicji enzymów został określony jako typ inhibicji kompetycyjnej;
- na podstawie badań *in silico* i *in vitro* wskazano toksoplazmowe hydroksylazy aminokwasów aromatycznych jako potencjalny cel molekularny dla pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu 2a oraz 6a;
- pochodne 2a oraz 6a wykazały istotną aktywność przeciwzapalną poprzez blokowanie szlaku NF- κ B w ludzkich monocytach;
- analiza farmakokinetyczna pochodnych 2a oraz 6a w badaniach z użyciem samic myszy domowych szczepu BALB/c potwierdziła, że związki przedostają się do układu krążenia i znajdują się w surowicy ponad 24 godziny. Ponadto oba związki przechodzą barierę krew-mózg i są wykrywane do 12 godzin w mózgowiu.

Wyniki analiz dokonanych przez Doktoranta zostały już w dużej mierze opublikowane, a tym samym ocenione przez co najmniej kilku recenzentów i zmodyfikowane zgodnie z ich sugestiami. Nasuwa mi się jednak kilka pytań, o których wyjaśnienie chciałbym poprosić Doktoranta.

Zastanowiłbym się nad wnioskiem „potwierdzono brak właściwości toksycznych dla pochodnych 2a oraz 6a u samic myszy domowej szczepu BALB/c...”. Moim zdaniem wyniki Doktoranta sugerują brak lub niewielką toksyczność w stosunku do wybranych narządów (wątroba, nerki), jednak nie można na ich podstawie stwierdzić, że toksyczne nie są. Owszem badanie poziomu kreatyniny pozwala na określenie prawidłowości filtracji kłębuszkowej w nerkach i jest wskaźnikiem uszkodzenia nerek przez leki i toksyny. Pomiar stężenia kreatyniny w surowicy jest łatwy do wykonania, dostępny i tani. Niestety nie jest czuły, a stężenie

kreatyniny wzrasta dopiero wtedy, gdy szybkość filtracji kłębuszkowej spada o ponad 75% prawidłowej wartości. Dlatego badania nefrotoksyczności powinny być w przyszłości uzupełnione o pomiar szybkości filtracji kłębuszkowej i klirens egzogennej kreatyniny. Warto także połączyć badanie poziomu kreatyniny z oznaczeniem BUN (azot mocznika), który może być pomocny w ocenie nefrotoksyczności.

Dodatkowo można by przeprowadzić badania krwi oceniające ogólnie funkcje wątroby: spadek stężenia albuminy, wzrost INR (znormalizowany czas protrombinowy), wzrost bilirubiny, spadek glukozy.

W kontekście stwierdzonej przez Doktoranta braku toksyczności badanego związku proszę o wyjaśnienie, czy ich stosowanie może prowadzić do zaburzeń metabolicznych, krwiotwórczych, funkcjonowania innych układów, czy też zaburzeń endokrynologicznych? Czy były przeprowadzane dodatkowe analizy morfologiczne i biochemiczne parametrów krwi u badanych zwierząt? Mogło by to dostarczyć ważnych dodatkowych danych na temat farmakodynamiki potencjalnego leku.

Doktorant podaje, że analizowane związki przenikają przez barierę krew mózg, proszę o wyjaśnienie czy był badany ich wpływ na funkcjonowanie mózgowia i zachowanie zwierząt? Czy istnieje możliwość, że związki te mogą ujawnić właściwości neurotoksyczne lub zaburzać behavior?

Proszę o wyjaśnienie, kto dokonywał oceny patomorfologicznej pobranych tkanek? Jeśli nie robił tego doświadczony patomorfolog, część zmian patologicznych w wątrobie mogła zostać niezauważona? Czy planowane jest wykorzystanie pomiaru poziomu markerów nekrozy/apoptozy w tkankach? Dlaczego nie zostały przeprowadzone badania patomorfologiczne nerek?

Jaka była internalizacja badanych przez doktoranta pochodnych do wakuoli pasożytniczych i komórek żywiciela oraz w jaki sposób ten pomiar wykonano?

Analizowane pochodne Doktorant podawał zwierzętom dożołądkowo. Z ciekawości chciałbym spytać czy można badane związki podać domięśniowo, dożylnie, dootrzewnowo? Jeśli nie, to dlaczego?

Na koniec tradycyjnie proszę Doktoranta o wskazanie, który z uzyskanych wyników chciałaby uznać za najważniejszy i dlaczego?

Niezależnie od zawartych w recenzji drobnych uwag, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Adriana Zdzisława Bekiera. Otrzymane wyniki są niewątpliwie wartościowymi i znacznie poszerzają naszą wiedzę o potencjale terapeutycznym tiosemikarbazydu w toksoplazmozie. Zastosowanie odpowiednio dobranej metodyki oraz różnorodność przeprowadzonych analiz, świadczy o kompleksowym podejściu do rozwiązania problemu badawczego. Natomiast opublikowanie wyników, jako autor wiodący, dowodzi dojrzałości i samodzielności Doktoranta oraz wartości naukowej uzyskanych rezultatów.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji pragnę podkreślić, że bardzo wysoko oceniam przedstawioną rozprawę mgr Adriana Zdzisława Bekiera oraz stwierdzam, że niewątpliwie spełnia ona wymagane przepisami wymogi stawiane pracom doktorskim. Wniosuję zatem do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Adriana Zdzisława Bekiera do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przedstawiona rozprawa cechuje się wyróżniającą jakością badań, przeprowadzonych z użyciem nowoczesnych metod oraz posiada istotne walory poznawcze. Uznając wysoką i unikalną wartość wyników badań, opublikowanych w znaczących czasopismach naukowych, których pierwszym autorem jest mgr Adrian Zdzisław Bekier **wniosuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie** ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Katedra i Zakład Biologii Ogólnej
i Parazytologii

prof. n. med. Daniel Młocicki