Prof. dr. hab. n. med. Zenon Czuba

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

ul. H, Jordana 19,

41-808 Zabrze

Tel.: 32 272 25 54, e-mail: mikroimm@sum.edu.pl . zczuba@sum.edu.pl

Zabrze, 2.08.2024r.

**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej pod tytułem „Synteza pochodnych aldehydów hydroksybenzoesowych o potencjalnych właściwościach inhibitorów ludzkiej heksokinazy 2 (HK2)" wykonanej przez mgr inż. Karolinę Juszczak.**

**Promotor rozprawy doktorskiej: Prof. dr hab. inż. Krzysztof Walczak.**

Proces karcynogenezy jest wieloetapowy. Główne etapy nowotworzenia to inicjacja, promocja i progresja. Transformacja komórki w komórkę nowotworową może być indukowana wieloma czynnikami znajdującymi się zarówno wewnątrz organizmu, jak i pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego. Czynnikami wewnętrznymi indukującymi mutacje są najczęściej reaktywne formy tlenu i azotu, powstające w długotrwałym procesie zapalnym np. związanym z procesem starzenia organizmu - „inflammaging". Wśród bardzo wielu czynników pochodzenia zewnętrznego można wymienić czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. Jednak to czy dojdzie do rozwoju nowotworu w organizmie zależy od stanu jego układu odpornościowego. Ujmuje to między innymi koncepcja tak zwanego immunoredagowania nowotworu, zwana też koncepcją trzech E, pochodząca od angielskich słów rozpoczynających się na tę literę (*elimination* – eliminacja, *equilibrium* – równowaga i *escape* – ucieczka). W pierwszym etapie komórki nowotworowe są likwidowane przez układ odpornościowy, w kolejnym etapie rozwoju komórki nowotworowe pozostają w równowadze z układem odpornościowym, a w trzecim etapie komórki nowotworowe zaczynają dominować prowadząc do szybkiego wzrostu masy nowotworu. Dodatkowym problemem w rozwoju nowotworu są powstające nowotworowe komórki macierzyste, co znacznie utrudnia terapię. Ponadto komórki nowotworowe, w odróżnieniu od komórek zróżnicowanych, charakteryzują zmiany w glikolizie tzw. efekt Wartburga, co może przypominać metabolizm komórek proliferujących. Kluczowym enzymem tego procesu jest heksokinaza 2. Zablokowanie tego szlaku metabolicznego może hamować wzrost komórek nowotworowych i może być wykorzystane jako element terapii przeciwnowotworowej. Stąd próby poszukiwania nowych, skutecznych inhibitorów heksokinazy 2, a jednocześnie charakteryzujących się niską toksycznością, przez Doktorantkę wydają się bardzo zasadne.

Z informacji zamieszczonej przez Doktorantkę na stronie 163 rozprawy doktorskiej wynika, że część wyników została już opublikowana w *Molecules* w 2024 roku oraz w *Inernational Journal of Molecular Sciences* w 2022 roku. W obu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny współczynnik oddziaływania IF tych czasopism wynosi 10,2, a sumaryczna

punktacja MEIN = 280. Według Web o Science druga praca została zacytowana 6 razy (bez autocytacji, dane z dnia 2.08.2024r.). Według bazy PubMed Doktorantka jest współautorką 4 prac z listy JCR.

Oceniana rozprawa doktorska liczy163 strony i jest napisana zgodnie z wymogami dla tego typu opracowań. Na początku rozprawy znajdują się streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, następnie spis treści oraz wykaz skrótów i symboli, część teoretyczna, cel pracy, część badawcza, badania biologiczne, część eksperymentalna uwzględniające odczynniki i szczegółowe metodyki, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo składające się z 173 pozycji zestawionych w kolejności cytowań. Po piśmiennictwie znajdują się załączniki zawierające uzyskane widma rezonansu protonowego i $^{13}C$ oraz widma spektrometrii masowej zsyntezowanych związków. Na ostatniej stronie znajduje się wykaz dorobku naukowego Doktorantki związanego z doktoratem.

Część teoretyczna (od 11 do36 strony) rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem, a następniei w kolejnych podrozdziałach Doktorantka charakteryzuje zasady Schiffa i wybrane pochodne hydrazyny (hydrazynę, hydrazydy, hydrazony i hydrazono-hydrazydy) oraz sposoby redukcji wiązania iminowego oraz metody zabezpieczenia grupy aminowej podczas syntezy. W części biologicznej możemy znaleźć opis metabolizmu komórki nowotworowej ze szczególnym uwzględnieniem efektu Wartburga oraz znaczenie heksokinazy w tym procesie. Następnie opisano metody terapii z wykorzystaniem heksokinazy 2 jako celu molekularnego. Kolejne podrozdziały zostały poświęcone terapii skojarzonej z uwzględnieniem inhibitorów heksokinazy 2 oraz ich skuteczności także z uwzględnieniem metody dokowania molekularnego. Część teoretyczną kończą podrozdziały charakteryzujące potwierdzone inhibitory heksokinazy 2 ze szczególnym uwzględnieniem benserazydu (Benz) i benitrobenrazydu (BNBZ), które u Doktorantki stanowią podstawę do modyfikacji struktur w celu uzyskania potencjalnych związków o lepszych parametrach terapeutycznych.

W części badawczej (strona 37) Doktorantka wyjaśnia cel swoich badań, który zakładał syntezę oraz sprawdzenie aktywności hamującej HK 2 związków uwzględniających strukturę Benz i BNBZ różniących się:

- liczbą i położeniem grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym,

- zastąpieniem grupy nitrowej w BNBZ innymi grupami funkcyjnymi,

- zastąpieniem seryny w Benz innymi aminokwasami,

- wprowadzeniem różniących się wielkością podstawników aromatycznych oraz grupy etylowej w strukturze N-acylowych pochodnych hydrazonów 2,3,4-trihydroksybenzaldehydu

- redukcją wiązania iminowego wybranych pochodnych N-acylowanych hydrazonów.

Następnie w tej części zostały opisane liczne metody syntez wybranych pochodnych oraz przedstawiono dowody potwierdzające uzyskanie określonych struktur chemicznych. Podczas syntezy do weryfikacji uzyskanych związków stosowano chromatografię cienkowarstwową, spektrometrię rezonansu protonowego i węgla $^{13}C$ oraz spektrometrię masową. Po każdym opisie syntezy znajdują się określone widma oraz ich analiza. Na szczególną uwagę zasługują

opisy napotkanych trudności i sposobów rozwiązania powstałych problemów podczas przeprowadzanych syntez. Dowodzi to, że Doktorantka jest dobrze przygotowana w zakresie pracy naukowej.

Badania aktywności wybranych związków w hamowaniu heksokinazy 2 oceniano za pomocą standardowych zestawów opierających się na metodzie spektrofotometrycznej oraz metodzie wykorzystującej chromatografię cieczową, co umożliwiło weryfikację uzyskanych efektów inhibicji.

Do optymalizacji liczby i położenie grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym badanych związków posłużono się także metodą dokowania molekularnego. W badaniach potencjalnej cytotoksyczności wybranych związków posłużono się dwiema liniami komórek nowotworowych HepG2 i Huh7. W tym celu po hodowli komórek z wybranymi związkami oceniano stan ich żywotności metodą redukcji MTT do formazanu, którego stężenie po ekstrakcji dimetylosulfotlenkiem (DMSO) oceniano metodą spektrofotometryczną. Ponadto wykorzystując powyższe linie komórkowe oceniono aktywność związków w teście klonogenności. Duże znaczenie w aktywności biologicznej związków ma ich powinowactwo do HK2. Powinowactwo to Doktorantka oceniła stosując termoforezę mikroskalową (MST)

Uzyskane wyniki w rozprawie zostały przedstawione w sposób przejrzysty w postaci rycin oraz w tabelach, a także poddano je właściwej interpretacji.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na drobne błędy zauważone w rozprawie doktorskiej:

- str. 26: powinno być „rak piersi, płuca"

- str.27: w pierwszym zdaniu rozdziału 2.8.1. „komórki tlenowe" powinny być zastąpione np. przez „komórki w normoksji"

- liczne miejsca: „terapię skojarzeniową" proponuję zastąpić „terapią skojarzoną",

- tekst pracy: „*orto, meta, para*" powinny być pisane kursywą

- tam gdzie znajdują się elementy policzalne należy używać „liczby", a nie „ilości" np. „liczba grup hydroksylowych", a nie „ilość grup hydroksylowych",

- tekst pracy: w wielu miejscach należałoby zastąpić „poziom" „stężeniem".

Powyższe drobne błędy nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne opracowanie naukowe bardzo pomocne w pracy nad nowymi lekami i wnosi istotny wkład do dyscypliny nauk chemicznych, a wyniki opublikowane w postaci dwóch prac oryginalnych z listy JCR zostały już pozytywnie zrecenzowane w czasopismach i są cytowane przez innych autorów.

**Według mojej oceny rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Juszczyk spełnia wszystkie kryteria określone w obowiązującej Ustawie. Mam zatem zaszczyt zwrócić się do**

**Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej w Gliwicach z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Juszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

*Podpisano odręcznie przez autora*