



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak

Katedra i Zakład Toksykologii

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

e-mail: maria.walczak@uj.edu.pl; tel.
+4812/6205630

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Macieja Nogi

Kraków, dn. 30 sierpnia 2023 r.

Ocenę przygotowano na podstawie pisma Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, INM 175/23 z dn. 12 lipca 2023 r.

Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr inż. Macieja Nogi o stopień naukowy doktora są 4 spójne publikacje – 2 prace przeglądowe oraz 2 prace oryginalne dotyczące tematyki zatytułowanej „Badania wybranych parametrów toksykologicznych dla związków fosforoorganicznych z grupy Novichok przy użyciu metod toksykologii *in silico*”.

Rozprawa doktorska obejmuje 86 stron i składa się z wykazu skrótów użytych w pracy, wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, zestawienia publikacji Doktoranta, wstępu będącego wprowadzeniem do aspektu biologicznego i analitycznego tematu, celu pracy, opisu zastosowanej metodologii, wyników badań z ich dyskusją, wniosków, kopii publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, bibliografii składającej się z 49 pozycji ułożonych w sposób logiczny i uporządkowany oraz oświadczeń współautorów.

Ocena rozprawy doktorskiej

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr inż. Macieja Nogi była kompleksowa ocena wybranych parametrów toksykologicznych dla związków fosforoorganicznych z grupy Novichok, o potencjalnym zastosowaniu jako środki bojowe, w aspekcie właściwości fizyko-

chemicznych, bezpieczeństwa toksykologicznego oraz szybkości eliminacji tych związków z organizmu człowieka i środowiska naturalnego.

Doktorant podjął się nietrywialnych badań nad przewidywaniem wybranych parametrów toksykologicznych związków z grupy Novichok z zastosowaniem narzędzi *in silico*. Zagadnienia poruszane przez Autora są oryginalne i nie zostały opisywane do tej pory w literaturze naukowej przez innych badaczy, a wybór związków jest dobrze uzasadniony merytorycznie.

Oceniana praca doktorska wykonana w Instytucie Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego oraz w Zakładzie Toksykologii Regulacyjnej i Sądowej Instytutu Ekspertyz Medycznych w Łodzi pod kierunkiem Promotora dr hab. Kamila Jurowskiego, prof. UR, prof. IEM oraz Promotora pomocniczego dr n. med. Agaty Michalskiej jest przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów biodegradacji związków i ich wpływu na bezpieczeństwo.

Streszczenie pracy stanowi wnikliwą syntezę tematu odzwierciedlającą poszczególne części rozprawy, podkreślając najważniejsze informacje opisane szczegółowo w kolejnych rozdziałach dysertacji.

W **części teoretycznej** pracy Doktorant przedstawił informacje naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W pierwszej części wstępu wprowadzono czytelnika w temat chemicznych bojowych środków trujących o działaniu paralityczno-drgawkowym, znanych w literaturze naukowej jako Novichok. W rozdziale tym zwrócono uwagę na niewielką ilość danych oraz niepewność informacji zawartych w literaturze naukowej na temat tych środków bojowych. W bazie PubMed dostępnych jest 61 publikacji naukowych poświęconych związkom z rodziny Novichok. Niezwykle istotne jest zwrócenie przez Doktoranta uwagi na temat braku spójnych informacji o budowie chemicznej związków fosforoorganicznych zaliczanych do serii A (fosforamidy lub fosforylowane oksymy). W tym aspekcie różni badacze proponują odmienne struktury chemiczne związków oznaczanych tym samym akronimem, co stanowi jeden z ważnych problemów współczesnej toksykologii.

Z uwagi na wysoką toksyczność związków zaliczanych do serii A i ich obecność w przestrzeni publicznej, w rozdziale tym podkreślono konieczność badań nad ustaleniem struktury chemicznej tych związków, przeprowadzenia pełnych badań toksykologicznych oraz opracowania skutecznych metod leczenia, w tym szybko działających odtrutek.

W tym aspekcie Doktorant zwrócił uwagę na konieczność badania stabilności związków zaliczanych do serii A w środowisku naturalnym, w szczególności na ocenę szybkości procesów hydrolizy i biodegradacji oraz poszukiwanie skutecznych metod dekontaminacji. Od rodzaju i szybkości przemian związków zależy nie tylko siła ich działania farmakologicznego ale również występowanie działań niepożądanych i toksycznych, wpływając w ten sposób na bezpieczeństwo osób przypadkowo narażonych. W moim odczuciu zamieszczenie w dysertacji wzorów strukturalnych związków oraz schematu z potencjalnymi ścieżkami biotransformacji tych związków, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych byłoby pomocne w lepszym zrozumieniu ścieżek biodegradacji związków będących przedmiotem badań. Po lekturze wstępu nasuwa się pytanie o bezwzględną konieczność wykonania badań tych związków w warunkach *in vivo*, z użyciem gryzoni laboratoryjnych czy modelu Danio

pręgowany (*Danio rerio*). Podsumowując w rozdziale tym, Autor w sposób przejrzysty i zwięzły dowiódł bardzo dobrej znajomości badanej problematyki.

W **celu** pracy Autor uzasadnił istotę i znaczenie podjętych badań oraz przedstawił ogólne założenia pracy, skupiające się na określeniu wybranych parametrów toksykologicznych dla 17 związków fosforoorganicznych z grypy Novichok w warunkach *in silico*. Zaprezentowany cel oraz postawione pytania badawcze sygnalizują szeroki zakres pracy włożonej w realizację ambitnych założeń, co zresztą znajduje potwierdzenie w dalszych częściach rozprawy.

W części poświęconej **materiałom i metodom** Doktorant dokładnie opisał zastosowane procedury badawcze, które pozwoliły na szczegółowe śledzenie zaplanowanych etapów badań i uzyskane wyniki. Wykonanie tych badań wymagało przeprowadzenia dużej ilości czasochłonnej i pracochłonnej analiz komputerowych. W rozdziale tym Autor po zapoznaniu czytelnika ze sposobem wyszukiwania związków stanowiących przedmiot badań opisuje wykonane symulacje komputerowe celem przewidywania profilu bezpieczeństwa badanych związków.

Wzorując się na opublikowanych przez innych autorów metodach przewidywania właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych związków, w metodyce opisano trzy dostępne komercyjnie specjalistyczne oprogramowania komputerowe, takie jak QSAR Toolbox wersja 4.5, Estimation Program Interface (EPI) Suite wersja 4.11, TEST (Toxicity Estimation Software Tool) wersja 4.2.1 oraz 5.1.2 zatwierdzone przez OECD oraz US EPA i pozwalające na wyznaczenie podstawowych parametrów toksykologicznych dla związków chemicznych.

W moim odczuciu przybliżenie możliwości przewidywania parametrów toksykologicznych przez użyte programy komputerowe, szczegółowe i krytyczne podejście do zastosowanej metody, wypunktowanie różnic pomiędzy zastosowanymi programami oraz wskazanie na wady i zalety każdego z podejść, pozwoliłoby na lepsze zrozumienie znaczenia wybranych metod *in silico* i ocenę ich wpływu na wyniki badań, a tym samym interpretację biologiczną uzyskanych wyników. Pytanie, które nasuwa mi się po lekturze tej części pracy wiąże się z walidacją metody, a mianowicie czy zastosowane metody *in silico* były walidowane? Jeśli tak, to w jaki sposób? Czy sprawdzono sposób przewidywania parametrów toksykologicznych dla związków modelowych, o znanym profilu bezpieczeństwa?

Kolejną część pracy stanowi przedstawienie **wyników** z przeprowadzonych badań. Struktura i forma zaprezentowanych wyników jest czytelna i umożliwia łatwe poruszanie się czytelnika po opisywanych zagadnieniach. Pierwsze dane dotyczą wyznaczenia LD50 dla 17 związków typu Novichok po doustnym podaniu u szczurów z zastosowaniem oprogramowania QSAR Toolbox oraz TEST przy użyciu metodologii konsensus i FDA oraz ekstrapolacji danych ze szczura na człowieka bazując na pracy Nair AB, Jacob S, opublikowanej w J Basic Clin Pharm (2016). Analizując dane zebrane w tabeli 1 widoczne są różnice w przewidywanych wartościach LD50, co przekłada się na ekstrapolację danych ze szczura na człowieka. Czy Doktorant mógłby wyjaśnić przyczynę tej rozbieżności?

W rozdziale tym Doktorant przeprowadził analizę uzyskanych wyników, konfrontując badania własne z osiągnięciami innych zespołów badawczych. Autor wykazał, że związki o akronimach A-232, A-234, A-230, C01-A043 oraz C01-A040, z uwagi na najniższe wartości LD50 stwarzają największe zagrożenie dla człowieka. Po lekturze tego rozdziału, z uwagi na

widoczne różnice w przewidywanych wartościach LD50 z zastosowaniem różnych programów komputerowych nasuwa się pytanie o wiarygodność wyników. Czy używano tych programów do przewidywania LD50 u szczurów po podaniu doustnym innych związków? Czy dla tzw. związków modelowych uzyskano również niejednorodne wyniki? Czy Autor mógłby wyjaśnić jaki jest wpływ danych wejściowych na przewidywanie LD50? Czy dane literaturowe zebrane w tabeli 2 dla siedmiu związków typu Novichok dotyczą LD50 u szczurów czy u ludzi? W jaki sposób autorzy przytaczanych prac wyznaczyli LD50? Jakie oprogramowanie zostało użyte? Doktorant koreluje wyniki z literatury ze środkami VX i GD, przy braku w tabeli 2 danych dla związku GD. Według Autora nie ma danych w literaturze dla związku GD, skąd zatem wprowadzenie związku GD do dyskusji wyników?

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił wyniki badań z przewidywania biodegradacji związków typu Novichok z zastosowaniem siedmiu modeli Biowin, które klasyfikują związki na szybko i wolno biodegradujące. W tym aspekcie, przydatnym byłoby przybliżenie czytelnikowi, które wielkości fizyko-chemiczne posłużyły do ustalenia kryterium kwalifikacyjnego $\geq 0,5$ lub $< 0,5$, szczególnie w aspekcie przewidywania biodegradacji substancji w warunkach tlenowych lub beztlenowych?

Oceniając hydrolizę związków z rodziny Novichok, Doktorant posłużył się oprogramowaniem QSAR Toolbox i EPI Suite, stosując jako kryterium przewidywania okres półtrwania hydrolizy w pH 6,5 – 7,4. Z uwagi na istotne różnice w szybkości hydrolizy analizowanych związków, wynoszące od kilku do kilku tysięcy godzin, pomocne byłoby wyjaśnienie, które dane eksperymentalne wprowadzone do oprogramowania w największym stopniu wpływają na wyniki przewidywań.

W przedstawionej do recenzji pracy, badania zaplanowano w sposób przemyślany, wyniki przedstawiono w sposób jasny i precyzyjny, a dyskusja, chociaż nie ujęta w tytule podrozdziału jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych angielskich pozycjach literaturowych.

Pod względem edytorskim, pomimo kilku potknięć, praca została zredagowana starannie. Pracę charakteryzuje potencjalna wartość aplikacyjna uzyskanych wyników badań. Wyniki, które oceniam bardzo wysoko, świadczą o samodzielności naukowej i badawczej Autora, swobodzie poruszania się w zagadnieniach z obszaru toksykologii, a w szczególności w tematyce bojowych środków trujących oraz umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w obszarze związków z rodziny Novichok. Rozprawa jest skonstruowana w sposób estetyczny i przejrzysty. Doktorant swobodnie posługuje się precyzyjnym językiem naukowym i adekwatnie stosuje terminologię związaną z przedmiotem pracy.

W pracy nie znaleziono błędów interpunkcyjnych, ortograficznych lub gramatycznych, jedynie drobne błędy literowe na str. 7, 9, 19 i 21 lub nieścisłości, takie jak wyjaśnienie skrótu CWC na str. 2; lista Konwencji o zakazie broni chemicznej na str. 5, o jaką listę chodzi?; nazwa ośrodka badawczego – Instytut Badań Naukowych Chemii i Technologii Organicznej Rosyjskiego Państwowego Związku (GosNIIOKhT)? Poprawna nazwa instytucji to Państwowy Instytut Naukowo-Badawczy Chemii i Technologii Organicznej (GosNIIOKhT); czas półtrwania – poprawnie powinno być okres półtrwania. W spisie literatury zauważono pewną niekonsekwencję w przytaczaniu nazw czasopism, tj. pełna nazwa czasopisma lub wersja skrócona, spowodowaną najprawdopodobniej stosowaniem jednego z programów do

automatycznego wprowadzania referencji, a które niestety często wprowadzają błędy edytorskie. Powyższe komentarze nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Podsumowanie

Reasumując należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Nogi jest oryginalnym i kompleksowym opracowaniem dotyczącym przewidywania wybranych parametrów toksykologicznych dla związków fosforoorganicznych z grupy Novichok z zastosowaniem metod *in silico*. Badania zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem odpowiednich narzędzi badawczych, a Doktorant przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazał się odpowiednią wiedzą merytoryczną. Wyniki badań zostały opublikowane w dwóch publikacjach oryginalnych, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, takich jak Science of the Total Environment (2023) oraz w Archives of Toxicology (2023). W pracach tych Doktorant jest pierwszym autorem,

Podjęte badania są niezwykle ważne ze względu na możliwość aplikacji uzyskanych wyników w obszarze bezpieczeństwa ludzi i środowiska. Wymiernym efektem dysertacji mgr inż. Macieja Nogi jest dostarczenie informacji pozwalających na przewidywanie zagrożenia środowiskowego w efekcie zamierzonego lub przypadkowego zastosowania związków fosforoorganicznych. Z uwagi na fakt, udokumentowanego użycia w ostatnich latach związków zaliczanych do bojowych środków trujących, podjęte w pracy doktorskiej przez mgr inż. Macieja Nogę zadanie oceny bezpieczeństwa 17 związków zaliczanych do grupy Novichok wpisuje się w aktualny nurt badań, a tematyka poruszana przez Autora ma znaczenie praktyczne, w dziedzinach związanych ze zdrowiem człowieka i bezpieczeństwem środowiskowym. Biorąc pod uwagę zakres prac, uzyskane przez Doktoranta wyniki należy uznać za znaczącą nowość naukową i niewątpliwie duże jego osiągnięcie badawcze.

We **wniosku końcowym** stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, pt. „Badania wybranych parametrów toksykologicznych dla związków fosforoorganicznych z grupy Novichok przy użyciu metod toksykologii *in silico*” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość aplikacyjną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktoranta. Rozprawę doktorską uważam za interesującą i ważną w kontekście zagrożeń toksykologicznych jakie powodują związki fosforoorganiczne. Dysertacja mgr inż. Macieja Nogi w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187. - [Rozprawa doktorska] i wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr inż. Macieja Nogi do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom przedstawionej dysertacji oraz opublikowanie wyników badań w dwóch oryginalnych pracach, w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, zwracam się do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak