

Szczecin, 23.05.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Adriana Zdzisława Bekiera

pt.: „Identyfikacja celu molekularnego u *Toxoplasma gondii* dla pochodnych tiosemikarbazydu oraz ocena ich wpływu na przebieg toksoplazmozy”, którą wykonał pod kierunkiem Pani dr hab. n. biol. Katarzyny Dzitko, prof. UŁ z Katedry Mikrobiologii Molekularnej (Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki) oraz Prof. dr hab. n. farm. Agaty Paneth z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej (Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej (Uniwersytet Medyczny w Lublinie).

Recenzja została wykonana na zlecenie Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne zgodnie z pismem z dnia 26.04.2022 r. podpisanym przez Przewodniczącą Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne – Prof. dr hab. Agnieszkę Marczak

I. Ogólna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska mgr. Adriana Bekiera składa się z 3 publikacji naukowych – w tym dwóch prac oryginalnych opublikowanych oraz jednej złożonej do druku i przyjętej do recenzji. We wszystkich przedstawionych do oceny publikacjach, stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Pan mgr Adrian Bekier jest pierwszym Autorem, a jego udział procentowy wyniósł 60%. Poniżej przedstawiam wykaz prac z danymi bibliometrycznymi i udziałem Pana mgr. Adriana Bekiera zgodnie z załączonymi oświadczeniami:

1. **Bekier A.**, Węglińska L., Paneth A., Paneth P., Dzitko K.: 4-Arylthiosemikarbazide derivatives as a new class of tyrosinase inhibitors and anti-*Toxoplasma gondii* agents. *J. Enz. Inhib. Medic. Chem.* 2021; 36:1, 1145-1164 (IF 5,051; punkty MEiN 140)

Pan mgr Adrian Bekier w tej pracy oryginalnej współtworzył koncepcję pracy, planował i wykonywał większość doświadczeń (cytotoksyczność związków, aktywność przeciw *T. gondii*, badania enzymatyczne), a także analizował i interpretował wyniki oraz przygotowywał manuskrypt do czasopisma. Ponadto

praca została wykonana i opublikowana w ramach projektu, którego Pan mgr Adrian Bekier był kierownikiem.

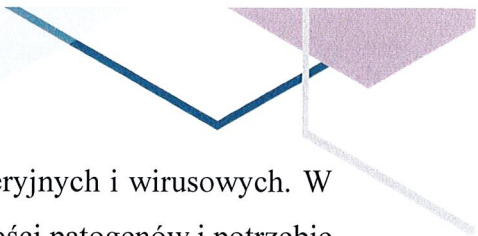
2. **Bekier A.**, Brzostek A., Paneth A., Dziadek B., Dziadek J., Gatkowska J., Dzitko K.: 4-Arylthiosemicarbazide derivatives as a toxoplasmic aromatic amino acid hydrolase inhibitors and anti-inflammatory agents. *J. Mol. Sci.* 2022; 23(6), 3213 (IF 5,924, punkty MEiN 140)

W tej pracy Pan mgr Adrian Bekier współtworzył koncepcję pracy, planował i wykonywał większość doświadczeń (w tym hodowla *T.gondii*, otrzymywanie rekombinowanych hydroksylaz aminokwasów aromatycznych, badania enzymatyczne, test powinowactwa związku do białka, badanie aktywności przeciwwzapalnych). Wkład w tę pracę Pana mgr. Adriana Bekiera polegał także na analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu do druku oraz ponownie – jak powyżej – praca została wykonana i wydana w ramach grantu, którym Pan mgr Adrian Bekier kierował.

3. **Bekier A.**, Gatkowska J., Chyb M., Sokołowska J., Chwatko G., Głowacki R., Paneth A., Dzitko K.: 4-Arylthiosemicarbazide derivatives – pharmacokinetics, toxicity and anti-Toxoplasma gondii activity in vivo. *Eur. J., Medic. Chem.* (w recenzji) (IF 6,514, punkty MEiN 140).

Pan mgr Adrian Bekier w trzeciej z prac składających się na rozprawę doktorską wykonał zdecydowaną większość pracy, w tym współtworzenie koncepcji pracy, planowanie i wykonanie większości doświadczeń (w tym: podawanie związków/leków myszom, hodowla *T.gondii in vivo*, izolacja materiału od myszy do dalszych badań, wykonywanie testów immunoenzymatycznych fazy stałej, wykonywanie preparatów histologicznych z wątroby, analiza farmakokinetyczna, ocena toksyczności podostrej, ocena aktywności przeciwpasożytniczej, izolacja genomowego DNA, określanie liczby kopii genów tachyzoitów i bradyzoitów). Pan mgr Adrian Bekier dokonał także analizy i interpretacji wyników oraz przygotował manuskrypt, a także był kierownikiem projektu, będącym podstawą do wykonania badań i publikacji pracy.

Nie ulega najmniejszej wątpliwości, że zarażenie ludzi, jak i zwierząt hodowlanych *Toxoplasma gondii* stanowi wciąż istotny problem na świecie. Stąd nie dziwi zainteresowanie badaczy poszukiwaniem coraz to nowych i skuteczniejszych terapii tego zakażenia. Tematyka badań Pana mgr Adriana Bekiera wpisuje się zatem w ogólnościwiatowy trend reprezentowany przez mikrobiologów całego świata, których nadrzędnym celem staje się w progu XXI wieku



poszukiwanie alternatyw dla terapii pasożytniczych, ale także bakteryjnych i wirusowych. W ostatnim czasie, ludzkość dotkliwie przekonała się o swoistej wyższości patogenów i potrzebie nieustannego wytaczania coraz to bardziej zmyślnych działań przeciw nim. Pracując w zespole kierowanym przez Panią dr hab. Katarzynę Dzitko, prof. UŁ, Pan mgr Adrian Bekier w sposób naturalny kontynuuje badania tego zespołu, nadając im coraz to bardziej nowoczesny charakter. Okazało się bowiem, że najbardziej aktywnymi substancjami o charakterze przeciwpierwotniakowym względem *T.gondii* są pochodne tiosemikarbazydu. Stąd celem pracy Pana mgr. Adriana Bekiera było wskazanie celu molekularnego dla nowych pochodnych tiosemikarbazydu oraz wskazanie szlaku metabolicznego, który jest przez nie hamowany.

Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej wypełniają założony cel, doskonale wypełniając lukę badawczą w tym zakresie. Nie ma wątpliwości co do ich wysokiej jakości naukowej, co odzwierciedla jakość czasopism, do jakich zostały zgłoszone i w jakich opublikowane. Na szczególną uwagę w mojej ocenie zasługuje różnorodność metod wykorzystanych w przedstawionych do oceny pracach stanowiących rozprawę doktorską. Ich złożoność, a także deklaracja Pana mgr. Adriana Bekiera o ich samodzielnym wykonaniu, jest potwierdzeniem wyśmienitego przygotowania metodycznego i merytorycznego Pana Magistra. Nie należy bez stosownego komentarza pozostawić ważnych elementów, które zapewne wpłynęły na tak dobre przygotowanie Pana mgr. Adriana Bekiera, a mianowicie różnorodnych źródeł finansowania ocenianego projektu, który złożył się na powstanie rozprawy doktorskiej. Pan mgr Adrian Bekier jest kierownikiem projektu w ramach konkursu NCN – Preludium 16, pt.: „Właściwości przeciwpasożytnicze oraz identyfikacja molekularnych tarcz docelowych nowych pochodnych tiosemikarbazydu i tiazolidynonu w inwazjach o etiologii *Toxoplasma gondii* przyznanego na okres 2019-2022 (opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Dzitko, prof. UŁ). Ponadto prace te były realizowane dzięki dotacji celowej na rok 2019 na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców przez uczestników studiów doktoranckich otrzymanej na projekt pt.: „Pochodne tiosemikarbazydu i tiazolidynonu jako nowe inhibitory hydrolazy tyrozynowej”, a także w projekcie z Inkubatora Innowacyjności 4.0 w latach 2021-2022 pt.: „Nowe pochodne tiosemikarbazydu i tiazolidynonu w inwazjach o etiologii *Toxoplasma gondii* w badaniach *in vivo*”.

Z recenzenckiego obowiązku, ale również z nieskrywaną przyjemnością pragnę na korzyść Pana mgr. Adriana Bekiera docenić jego dotychczasową pracę naukowo-badawczą, którą przedstawił w części zatytułowanej „Dorobek naukowy”. Pan mgr Adrian Bekier, poza pracami składającymi się na rozprawę doktorską, jest współautorem 12 publikacji o łącznym IF 53,793 i punktach MEiN 1460, a także współautorem 9 patentów o zasięgu krajowym i 1 zgłoszenia.

Odbył 3 staże naukowe – w Politechnice Łódzkiej, Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Jest osiadaczem wszelkich niezbędnych szkoleń do pracy ze zwierzętami laboratoryjnymi. Prezentował 12 wystąpień ustnych na konferencjach, w tym 6 międzynarodowych oraz 19 posterów (w tym 13 na konferencjach międzynarodowych). Pan mgr Adrian Bekier działa także prężnie w zakresie organizacyjnym na rzecz Uczelni, pełniąc szereg ważnych funkcji, m.in. takich jak Przewodniczący Uczelnianej Rady Samorządu Doktorantów UŁ (2018-2020), czy Członek Wydziałowej Rady Samorządu Doktorantów WBiOŚ UŁ (2018-2022). Organizował i współorganizował wiele wydarzeń na rzecz Doktorantów UŁ. Odzwierciedleniem tejże wzorowej pracy są nagrody, jakie Pan mgr Adrian Bekier otrzymał, w tym: Medal Universitas Lodziensis Alumno Laude Dignissimo za wybitną działalność doktorancką na rzecz i dla dobra UŁ w roku 2022 oraz Nagrody Rektora UŁ w latach 2019 i 2020.

Jakość merytoryczna prac składających się na rozprawę doktorską oraz postawa naukowa Pana mgr. Adriana Bekiera pozwala na jednoznacznie pozytywną opinię o pracy naukowej Pana Magistra. Żywię także nadzieję, że Pan mgr Adrian Bekier zwiąże się na stałe z działalnością naukową, gdyż zdaje się rozumieć aspekty pracy naukowej w pełni, także w zakresie zdobywania środków na badania, poszukiwania aplikacyjnych rozwiązań i włączania się w życie społeczności akademickiej i pracy na jej rzecz.

II. Ocena merytoryczna pracy z omówieniem poszczególnych prac składających się na rozprawę doktorską

Praca 1: Bekier A., Węglińska L., Paneth A., Paneth P., Dzitko K.: 4-Arylthiosemicarbazide derivatives as a new class of tyrosinase inhibitors and anti-Toxoplasma gondii agents. J. Enz. Inhib. Medic. Chem. 2021; 36:1, 1145-1164

W pracy wykazano, że dwie pochodne 4-arylotiosemikarbazydu (2a i 6a) spośród 1a-9a i 1b-9b cechują się aktywnością przeciw pasożytniczą, która wyraża się jako zahamowanie wnikania i namnażania pierwotniaka w komórkach żywiciela. Aktywność ta związana jest z defektami w egzogennym transporcie Tyr do komórki pasożyta i zaburzeniem metabolizmu Tyr w tachyzoitach *T.gondii*.

Praca 2: *Bekier A., Brzostek A., Paneth A., Dziadek B., Dziadek J., Gatkowska J., Dzitko K.: 4-Arylthiosemicarbazide derivatives as a toxoplasmic aromatic amino acid hydrolase inhibitors and anti-inflammatory agents. J. Mol. Sci. 2022; 23(6), 3213*

W tej pracy, Autorzy z Panem mgr. Adrianem Bekierem na czele, postawili sobie za cel ocenę wpływu wybranych w I pracy pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu, tj. 2a i 6a, na aktywność enzymatyczną rekombinowanej hydroksylazy aminokwasów aromatycznych *T.gondii*. Badania wykazały, że oba związki – 2a i 6a hamują aktywność enzymatyczną hydrolaz aminokwasów aromatycznych i charakteryzują się niską stałą inhibicji. Stwierdzono, że pochodne 2a i 6a mogą stanowić cel molekularny dla pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu. Bardzo istotny wydaje się być także fakt hamowania przez te pochodne szlaku NF- κ B, co może mieć realny wpływ na reakcje odpornościowe w tym zarażeniu na poziomie molekularnym.

Praca 3: *Bekier A., Gatkowska J., Chyb M., Sokołowska J., Chwatko G., Głowacki R., Paneth A., Dzitko K.: 4-Arylthiosemicarbazide derivatives – pharmacokinetics, toxicity and anti-Toxoplasma gondii activity in vivo. Eur. J., Medic. Chem. (w recenzji)*

Dopełnieniem realizowanego przez Pana mgr. Adriana Bekiera celu rozprawy doktorskiej jest praca 3, w której oceniano aktywność pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu (2a i 6a) na modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy domowej szczepu BALB/c. Oceniano maksymalną dawkę tolerowaną pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu dla myszy domowej szczepu BALB/c oraz dokonano analizy farmakokinetycznej tych związków, w kontekście ich potencjalnego przekraczania bariery krew-mózg. Badania wykazały, że obie pochodne przekraczały tę barierę, a pochodna 6a osiągała wyższe stężenia w mózgowiu. Bardzo ważnym aspektem oceny farmakokinetycznej są także testy oceniające toksyczość kumulatywną i wpływ na aktywność hepatocytów w schemacie terapeutycznym potencjalnego wykorzystania pochodnych w leczeniu zarażenia *T.gondii*. Wydaje się, że ta praca ma duże znaczenie aplikacyjne i może stać się podstawą wdrożenia nowego leczenia tego zarażenia, które także zostało w tej pracy zaproponowane.

Na podstawie trzech prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, Pan mgr Adrian Bekier wysnuł następujące wnioski:

1. Związki z podstawnikiem meta-jodo lub para-nitro (6a, 6b R = m-Ph-I; 2a, 2b R = p-Ph-NO₂) wpływają na obniżenie liczby tachyzoitów w porównaniu do komórek nietraktowanych związkami oraz hamują ich namnażanie poprzez zatrzymanie podziału. Ponadto związki te skutecznie hamują wnikanie tachyzoitów do komórek

- żywiela oraz charakteryzowały się najniższymi wartościami IC50 względem *T. gondii* *in vitro*;
2. Pochodne 2a, 2b, 6a oraz 6b okazały się najlepszymi inhibitorami tyrozynazy pochodzącej z *Agaricus bisporus*;
 3. Badania *in silico* z wykorzystaniem struktur krystalicznych pozwoliły na potwierdzenie, iż toksoplazmowa hydroksylaza aminokwasów aromatycznych może być potencjalnym celem molekularnym dla dwóch wytypowanych pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu;
 4. Potwierdzono zahamowanie aktywności rekombinowanych hydroksylaz aminokwasów aromatycznych: AAH1 i AAH2 *T. gondii* przez pochodne 4-arylotiosemikarbazydu 2a i 6a.
 5. Wskazano toksoplazmowe hydroksylazy aminokwasów aromatycznych jako potencjalny cel molekularny dla pochodnych 4-arylotiosemikarbazydu 2a i 6a;
 6. Pochodne 2a oraz 6a wykazały istotną aktywność przeciwzapalną poprzez blokowanie szlaku NF- κ B w ludzkich monocytach;
 7. Potwierdzono brak właściwości toksycznych i wzrostu poziomu enzymów wątrobowych dla pochodnych 2a oraz 6a u samic myszy domowej szczepu BALB/c;
 8. Analiza farmakokinetyczna pochodnych 2a oraz 6a potwierdziła, że związki przedostają się do układu krążenia i przechodzą barierę krew-mózg i są wykrywane do 12 godzin w mózgowiu;
 9. Pochodne 2a oraz 6a wykazują istotną aktywność przeciw pasożytniczą i mogą stanowić podstawę do rozważań o nowym planie terapeutycznym zarażenia *T. gondii*.

III. Ocena końcowa pracy

Praca doktorska mgr. Adriana Bekiera pt.: „*Identyfikacja celu molekularnego u Toxoplasma gondii dla pochodnych tiosemikarbazydu oraz ocena ich wpływu na przebieg toksoplazmozy*” jest bardzo dobrym opracowaniem oryginalnym o wysokiej wartości merytorycznej. Założenia i cel pracy są w całości wykonane, a wnioski są swoiste. Mając na względzie wszystkie walory przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, a w szczególności:

- trafne zweryfikowanie aktualności problemu badawczego i swoistego rodzaju luki, którą badania te wypełniają;
- dobrze ugruntowaną wiedzę dotyczącą opracowywanego zagadnienia badawczego;
- właściwie zaplanowane i wykonane eksperymenty ze swoiście dobraną metodyką;

- poprawne konfrontowanie i argumentowanie, a także interpretację otrzymanych wyników i umiejętność dyskusyjnego dyskusowania ich z innymi;
- umiejętność pisania manuskryptów naukowych, które znajdują uznanie i są publikowane w najlepszych periodykach z dyscypliny;
- umiejętność właściwego wyciągnięcia wniosków;
- odwagę w wybraniu ostatecznego kształtu rozprawy doktorskiej w formie zbitki publikacji;
- doskonale przedstawienie sylwetki kandydata w przedłożonych do recenzji dokumentach;

stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. Adriana Zdzisława Bekiera napisana pod kierunkiem Pani dr hab. Katarzyny Dzitko, prof. UŁ oraz prof. dr hab. Agaty Paneth w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W związku z powyższym pragnę zwrócić się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne, o dopuszczenie mgr. Adriana Zdzisława Bekiera do dalszego postępowania kwalifikacyjnego, celem uzyskania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom merytoryczny pracy, a także jej potencjał aplikacyjny oraz bardzo szeroki wachlarz metod badawczych wykorzystanych w uzyskaniu celu rozprawy doktorskiej świadczący o imponujących umiejętnościach laboratoryjnych Kandydata, wnoszę do Wysokiej Rady o stosowne wyróżnienie. Pragnę z całą mocą podkreślić, że forma pracy doktorskiej w postaci zbitki artykułów opublikowanych/złożonych do druku w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania i ważnych dla dyscypliny naukowej w mojej ocenie zasługuje na wyróżnienie, podobnie jak sama sylwetka naukowa Pana mgr. Adriana Bekiera, który stanowi doskonały przykład wyróżniającego się młodego naukowca ze świetnymi perspektywami na przyszłość.

UNIWERSYTET SZCZECIŃSKI
IMMUNOLOGIA
Paulina Niedźwiedzka -Rystwej
dr h.c.b. Paulina Niedźwiedzka -Rystwej
prof. US