



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

Prof. dr hab. n med. Agnieszka Basta-Kaim

Kraków, 28.08.2023

Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej

Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja PAN

w Krakowie

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kazka pt. „*Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia metaboliczne w modelach in vitro*”

**wykonanej w Zakładzie Wstępnych Badań Farmakologicznych, Katedry Farmakodynamiki
Wydziału Farmaceutycznego UJCM**

**pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. n farm. Moniki Papież oraz promotora
pomocniczego dr Anny Jurowskiej.**

Pomimo wielu lat badań, choroby metaboliczne w tym cukrzyca pozostają w dalszym ciągu istotnym problemem społecznym i ekonomicznym. Jednocześnie często niezadawalająca skuteczność kontroli glikemii u pacjentów przyjmujących obecnie stosowane leki lub ich kombinacje wskazuje na potrzebę poszukiwania nowych bardziej efektywnych farmakoterapii tej jednostki chorobowej. Dotychczasowe badania w których pokazano, zwiększenie efektywności transportu glukozy do komórek, skuteczność w osłabianiu insulino-oporności czy też wzmacnianie endogennego potencjału insuliny w tkankach docelowych przez wanad, sugerują jego przydatność w modulacji deficytów metabolicznych, w tym korekty mechanizmów metabolizmu glukozy oraz lipidów w wątrobie oraz regeneracji komórek beta trzustki. Niestety opisuje się także istotne ograniczenia w stosowaniu związków wanadu, którego wielopłaszczyznowe działanie prowadzi do zróżnicowanych efektów biologicznych, niekiedy przeciwstawnych, znacznie obniżających efektywność lub wręcz wykluczających możliwości jego zastosowania. Tym samym projektowanie oraz synteza nowych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi stanowić może nie tylko innowacyjny kierunek badań, ale także przesądzić o ich przydatności w leczeniu deficytów o podłożu metabolicznym w tym cukrzycy typu 2.

W ten nurt poszukiwań doskonale wpisują się badania przedstawione w rozprawie doktorskiej przez Pana mgr Grzegorza Kazka, a przeprowadzone w zespołach badawczych Wydziału Farmaceutycznego (pod opieką dr hab. n farm. Moniki Papież) oraz Wydziału Chemii (pod opieką dr Anny Jurkowskiej). Ich głównym celem była ocena aktywności farmakologicznej nowo zsyntetyzowanych kompleksowych związków wanadu w zakresie modulacji metabolizmu węglowodanów i lipidów oraz analiza ich potencjalnej przydatności w terapii chorób o podłożu metabolicznym. Badania te mgr Kazek przeprowadził w modelach *in vitro* realizując cele szczegółowe

w tym: między innymi prowadząc ocenę przydatności badań fenotypowych w analizie efektywności farmakologicznej tych kompleksów, analizę wpływu i zależności pomiędzy strukturą kompleksów, a zróżnicowaniem ich efektów farmakologicznych, ocenę efektów cytotoksycznych wybranych kompleksów wanadu oraz pomiar przydatności kompleksów w modulacji zaburzeń metabolicznych w przebiegu niealkoholowego stłuszczenia wątroby (NAFLD) oraz insulino-oporności.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera krótki opis problematyki i uzasadnienie podjęcia tematu, jasno określony cel badań, krótkie omówienie modeli i metod doświadczalnych oraz opis merytoryczny przebiegu badań wraz z ich podsumowaniem, a kończy ją streszczenie w języku polskim i angielskim. Całość tekstu jest zwarta i ograniczona do kilkunastu stron maszynopisu, opatrzonej w końcowej części spisem piśmiennictwa. Mój niedosyt budzi brak umieszczenia w przesłanej mi do oceny dysertacji, dyskusji odnoszącej się do całości wyników uzyskanych w rozprawie lub chociażby rozbudowanych wniosków końcowych. Moim zdaniem takie podejście pozwoliłoby zapoznać się z kompleksowym poglądem Autora na uzyskane wyniki oraz płynące z badań wnioski. Jednocześnie byłaby to dogodna droga do zaproponowania istotnego zdaniem Autora kierunku dalszych badań w miejsce dość ogólnego stwierdzenia, że wyniki te stanowią „mocną podstawę do dalszego rozwoju badań nad selektywnym lub specyficznym działaniem nowych kompleksów”. Prosiłabym Autora w czasie obrony o komentarz w tej sprawie mając na uwadze fakt, że rozprawa powinna prezentować umiejętność kompleksowej analizy uzyskanych wyników, także na tle szeroko rozumianego dostępnego piśmiennictwa dotyczącego obszaru zaprezentowanych w pracy badań. Z obowiązku recenzenta wspomnę także, że w tej części rozprawy znalazłam nieliczne niedociągnięcia i błędy edytorskie między innymi: brak symbolu alfa przy skrócie nazwy cytokiny TNF; brak słowa transport w zdaniu: „podobne różnice aktywności zaobserwowano również w przypadku [14C]-deoksy-D-glukozy do tych komórek” (strona 15); brzmiące obco określenie „podstawa augmentacji” zamiast osłabienia insulino-terapii u pacjentów”, czy wreszcie mało precyzyjne sformułowanie „odwracały upośledzenie transportu”.

Kluczowe znaczenie dla oceny rozprawy ma niewątpliwie jej wartość merytoryczna, którą stanowi międzynarodowy Patent (uzyskany w roku 2014) oraz cykl 5 oryginalnych artykułów, datowanych na lata późniejsze, a mianowicie 2019-2023. Zgłoszenie patentowe „*Ocena działania przeciwcukrzycowego kompleksów wanadu w modelach in vitro*” sfinansowane zostało z funduszy Unii Europejskiej w ramach Funduszu Rozwoju Regionalnego, Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka. Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami udział mgr Kazka w jego powstaniu był znaczący (85%) i obejmował konceptualizację badań aktywności farmakologicznej kompleksów, wdrożenie i walidację modeli doświadczalnych oraz metod analitycznych, dyskusję wyników oraz określenie treści patentu. W ramach Patentu przedstawiono opis syntezy i charakterystykę fizyko-chemiczną nowych kompleksów wanadu z różnych grup strukturalnych, a w badaniach wstępnych wykazano ich zadawalającą aktywność farmakologiczną i brak działań cytotoksycznych w porównaniu ze związkami referencyjnymi o potencjale przeciwcukrzycowym wykorzystywanymi w klinice.

W dalszej części rozprawy mgr Kazek zaprezentował publikacje, które stanowią cykl poświęcony bardziej szczegółowym badaniom aspektów aktywności farmakologicznej i przydatności nowych kompleksów wanadu, jako kandydatów na leki wspomagające lub zastępujące te obecnie stosowane w terapii zaburzeń metabolicznych. Wszystkie prace mają punktację MNiSW (od 5-100 pkt), a prace II, III, IV także współczynnik wpływu (IF), który sumarycznie wynosi 10.136. Należy jednak dodać, że praca III ma do chwili pisania recenzji jedynie formę „preprintu” na platformie MDPI dla czasopisma *Pharmaceuticals (Basel)*. Mgr Kazek jest pierwszym autorem trzech prac oryginalnych, a w dwóch pozostałych ich współautorem. Opierając się na załączonych do rozprawy oświadczeniach współautorów wnioskuję o znacznym udziale Pana magistra w powstaniu wszystkich manuskryptów

(od 60-70%), który koncentrował się głównie na przygotowywaniu, prowadzeniu i analizie wyników uzyskanych w ich części farmakologicznej w zastosowanych modelach *in vitro*. Przedstawiony w pracach materiał wskazuje na jednorodność tematyczną, a jednocześnie na konsekwencję Autora w poszukiwaniu odpowiedzi na pojawiające się w kolejnych etapach realizacji rozprawy pytania.

W pracy I opublikowanej w czasopiśmie „*Science, Technology and Innovation*”, przebadano 110 kompleksów wanadu należących do grup strukturalnych objętych patentem pod kątem ich aktywności farmakologicznej (w jednym stężeniu) w tym wpływu na zużycie glukozy przez miocyty C2C12, akumulację lipidów w adipocytach (linia 3T3-L1) oraz sekrecję insuliny przez komórki beta trzustki RINm5F. Przeprowadzono także badania wpływu kompleksów na inhibicję fosfatazy PTP1B, oraz ocenę ich działania cytotoksycznego w warunkach *in vitro* w porównaniu ze związkami o klinicznej przeciwcukrzycowej efektywności (rosiglitazon, glibenklamid, kompleks wanadu BMOV). Wyniki tych badań stanowiły dla Pana magistra wskazówkę do dalszej analizy kompleksów pod kątem modulacji parametrów metabolicznych w fenotypowo zróżnicowanym materiale biologicznym. Co istotne, niektóre z nowych kompleksów wanadu wykazały wyższą efektywność przeciwcukrzycową jak dotychczas stosowane leki w klinice przy braku efektu cytotoksycznego w badanych układach.

W pracy II opublikowanej w „*Polyhedron*” opisano charakterystykę fizyko-chemiczną wybranych kompleksów wanadu typu ONO, a następnie analizowano ich zdolność do hamowania fosfataz ludzkich (PTP1B, LAR, SHP1, SHP2) oraz transportu [14C]-deoksy-D-glukozy do miocytów i adipocytów. Zagadką pozostaje, dlaczego w manuskrypcie tym nie zamieszczono standardowej analizy statystycznej wyników, a w przypadku przedstawienia wyników jako procent kontroli nie uwzględniono błędów statystycznych, jak np. w pracy III. Dodatkowo w legendach do rycin 13, 14 nie zamieszczono opisu symboli A, B dając konieczność ich poszukiwania na rycinie 12. Praca ta dostarcza ciekawych wyników wskazujących, że siła inhibicji tyrozynowych fosfataz nie determinuje jednoznacznie ich potencjału przeciwcukrzycowego wyrażonego jako transport glukozy.

Kontynuacją, a jednocześnie rozszerzeniem i uzupełnieniem tych badań są wyniki zaprezentowane w kolejnych manuskryptach. W obszernym opracowaniu stanowiącym pracę III wykazano, że kompleksy ONS z tioanilidowymi pochodnymi aminokwasów hamują ludzkie białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTP1B, LAR, SHP1, SHP2), a także kinazy nietyrozynowe (PPA2 i CDC25A) podobnie do związku referencyjnego BMOV. Związki te zwiększają także transport znakowanej radioaktywnie [14C]-deoksy-D-glukozy do miocytów, a VC070 nasila ten transport także w adipocytach. Wykazano, także że związki typu ONO z aldehydem 5-bromosalicylowym i podstawionymi benzhydrazydami jako składnikami ligandów typu zasady Schiffa miały niższy potencjał farmakologiczny w porównaniu z kompleksami ONS. Badane kompleksy hamowały akumulację lipidów w hepatocytach HepG2 w modelu niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Najszerszy panel aktywności wykazał związek VC068 typu ONO. Badając mechanizmy molekularne działania kompleksów w pracy tej wskazano na istotną rolę aktywacji kinaz AKT oraz ERK przez oba typy związków (ONS oraz ONO).

Zamieszczone w pracy IV (*Journal Coordination Chemistry*) oraz pracy V (*Science, Technology and Innovation*) wyniki badań doskonale wpisują się w nurt opisany w pracach Autora wspomnianych wcześniej. Wykorzystane w nich kompleksy nie tylko scharakteryzowano pod kątem ich właściwości fizyko-chemicznych, ale badano także ich potencjał insulino-mimetyczny w układach doświadczalnych w porównywaniu ze związkami referencyjnymi (jak BMOV, VOSO4 czy rosiglitazon). Jednocześnie dalsze badania ich aktywności farmakologicznej dostarczyły dowodów na znaczny potencjał tych związków do hamowania rekombinowanej ludzkiej fosfatazy tyrozynowej PTP1B, która odgrywa rolę w transdukcji sygnału i regulacji procesów komórkowych w tym

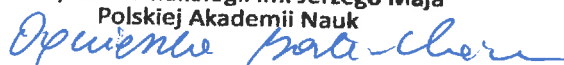
różnicowaniu i proliferacji preadipocytów do adipocytów (3T3-L1), a także na stymulacji zużycia glukozy przez te komórki.

W ocenianej rozprawie doktorskiej na podkreślenie zasługuje innowacyjność oraz potencjalna translacyjność wybranej tematyki, a szczególnie znaczne pogłębienie wiedzy dotyczącej kompleksowego podejścia do oceny potencjału farmakologicznego nowych kompleksów wanadu o różnej strukturze i zdolności do modulacji zaburzeń o podłożu metabolicznym przy braku działania cytotoksycznego. Walorami dysertacji są niewątpliwie także wielotorowość przeprowadzonych badań oraz dobrze przemyślany i trafny dobór modeli doświadczalnych (choć tylko *in vitro*) w oparciu o wiedzę merytoryczną Pana magistra. Zaprezentowany w rozprawie problem i warsztat badawczy, oraz umiejętność analizy uzyskanych wyników stanowią o wysokiej wartości poznawczej i są bezsprzecznie oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego podjętego przez pana mgr Grzegorza Kazka, dokumentując tym samym umiejętność prowadzenia samodzielnej pracy naukowej przez Autora niniejszej dysertacji.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że oceniana przeze mnie dysertacja pt. „*Wpływ wybranych kompleksów wanadu z ligandami organicznymi na zaburzenia metaboliczne w modelach in vitro*” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 ust 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. 2017., poz.1789 z późn. zm) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki farmaceutyczne UJ o dopuszczenie mgr Grzegorza Kazka do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Jednocześnie mając na uwadze fakt, iż niniejsza dysertacja prezentuje wysoki poziom merytoryczny, potencjalną translacyjność i/lub przydatność kliniczną uzyskanych wyników, co potwierdza patent międzynarodowy w niej przedstawiony, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kazka.

Kierownik Zakładu
Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk


Prof. dr hab. Agnieszka Basta-Kaim