

dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni

Gdańsk, 13 września 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Macieja Nogi
pt.: „Badania wybranych parametrów toksykologicznych dla związków
fosforoorganicznych z grupy Novichok przy użyciu metod
toksykologii *in silico*”

Recenzja została sporządzona w odpowiedzi na pismo (INM 174/23) prof. dr. hab. n. med. Adama Reich – Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Rzeszowskiego (Kolegium Nauk Medycznych, Instytut Nauk Medycznych) z dnia 17 lipca 2023 roku.

Pracę doktorską oceniłem pod kątem spełnienia kryteriów wskazanych w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykona w Instytucie Ekspertyz Medycznych w Łodzi (IEM), w Zakładzie Toksykologii Regulacyjnej i Sądowej. Promotorem rozprawy jest dr hab. n. med. i n. o zdr. Kamil Jurowski, prof. UR, prof. IEM a Promotorem pomocniczym dr n. med. Agata Michalska.

Rozprawa ma formę wydruku komputerowego o łącznej objętości 86 stron i ma układ charakterystyczny dla dysertacji opartych na zbiorze publikacji. Kopie wspomnianych publikacji będących efektem pracy Doktoranta są najbardziej obszernym rozdziałem rozprawy a poprzedzają go logicznie ułożone sekcje, których celem jest wprowadzenie, uzasadnienie podjęcia tematu badawczego, przedstawienie technik i metod badawczych, prezentacja wyników i wniosków. Spełniony jest też ustawowy wymóg zamieszczenia streszczenia w języku angielskim (dodatkowo jest także polskojęzyczne). Dwa ostatnie rozdziały zawierają odpowiednio bibliografię i oświadczenia współautorów publikacji o „wyrażeniu zgody na wykorzystanie danych publikacji do potrzeb rozprawy doktorskiej”, podczas gdy oświadczenia te zgodnie z zapisami przywołanego także Regulaminu przeprowadzania czynności w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora oraz stopnia doktora habilitowanego prowadzonych na Uniwersytecie Rzeszowskim z dnia 31 marca 2022 powinny zawierać „oświadczenia wszystkich jej współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie”. O udziale i roli poszczególnych autorów w przygotowaniu manuskryptów dowiadujemy się pośrednio z sekcji *contributions* w każdej z publikacji wchodzących w skład rozprawy. Z tych oświadczeń wynika, że Pan mgr inż. Maciej Noga brał udział w przygotowaniu pierwszych wersji wszystkich manuskryptów, przeprowadzał analizy i był odpowiedzialny za graficzne przedstawienie wyników. Stanowi to wystarczające dla recenzenta potwierdzenie istotnego wkładu Doktoranta w powstanie tych prac.

W odróżnieniu od recenzentów, którzy mieli okazję zapoznać się wyłącznie z poszczególnymi manuskryptami podczas recenzji na prośbę redakcji czasopisma, recenzent

rozprawy doktorskiej ma możliwość a jednocześnie jest to jego obowiązkiem, aby spojrzeć na zagadnienia omawiane w kilku publikacjach całościowo, ocenić zasadność podjęcia tematu, użyte techniki, metody i narzędzia a także ocenić wiarygodność, spójność, jakość i znaczenie uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska jest oparta na 4 publikacjach, z czego dwie są pracami przeglądowymi. Wszystkie publikacje ukazały się w 2023 roku i w każdej z nich mgr inż. Maciej Noga jest pierwszym autorem. Należy zwrócić uwagę, że czasopisma: *Archives of Toxicology*, *Journal of Clinical Medicine* oraz *Science of the Total Environment* to bardzo prestiżowe periodyki o uznanej renomie, wysoko punktowane w wykazach krajowych jak i międzynarodowych. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania Impact Factor czasopism wynosi 28,054 natomiast liczba punktów MEiN to 620. Warty odnotowania jest także dorobek Doktoranta niewchodzący w skład rozprawy (IF – 33,298 i 760 pkt. MEiN). Projekt doktorski nie był finansowany ze środków zewnętrznych pozyskanych na drodze konkursu.

Ocena merytoryczna

Acetylocholinoesteraza pełni kluczową rolę w przewodnictwie nerwowym jako enzym odpowiedzialny za rozkład neuroprzekaźnika – acetylocholino. Stanowi atrakcyjny farmakologiczny punkt uchwytu, wykorzystywany wielokierunkowo, od działania terapeutycznego, poprzez zwalczanie szkodników (insektycydy) po broń chemiczną. Hamowanie enzymu przynosi zarówno skutki ostre i opóźnione w wyniku jednorazowej ekspozycji jak i przewlekłe wynikające z długotrwałego narażenia na niewielkie dawki. Szereg związków o takim mechanizmie działania znajduje się w oficjalnych rejestrach broni chemicznej. Dwie prace przeglądowe wchodzące w skład rozprawy w sposób bardzo obszerny prezentują aktualną wiedzę na temat specyficznej grupy związków chemicznych o charakterze inhibitorów acetylocholinoesterazy określanych jako nowiczoki (ang. *Novichoks*). Jest to jedna z niewielu grup substancji chemicznych, dla których liczba dostępnych danych eksperymentalnych w domenie publicznej jest bardzo ograniczona. Do tego stopnia, że nawet na temat budowy chemicznej większości z nich trwają spekulacje. Z wiadomych względów nie prowadzi się badań tych substancji, nie są komercyjnie dostępne a publikowanie wyników tego typu badań może być wykorzystane w złym celu.

Z punktu widzenia bezpieczeństwa społecznego, każdy incydent z wykorzystaniem tego rodzaju broni chemicznej jest znaczącym zagrożeniem o nieprzewidywalnych skutkach. Dotychczas nowiczoki były wykorzystane do zwalczania pojedynczych osób, natomiast brak jest informacji na temat masowego użycia. Nie wyklucza to jednak możliwości powstawania wtórnych zatruć przypadkowych osób. Dotychczas udokumentowane przypadki zastosowania nowiczoków, opisywane przez Doktoranta i współautorów w publikacjach będących składowymi rozprawy, wskazują również na zagrożenia wynikające ze skażenia środowiska w miejscu ich aplikacji. Wskutek tego może dochodzić do zatruć wtórnych poprzez kontakt z zanieczyszczonymi przedmiotami, odzieżą itd. Mając na uwadze wysoką toksyczność ostrą tych związków, nieokreślony los i trwałość w środowisku, nowa wiedza w tych obszarach jest jak najbardziej pożądana. Niewielka jest ilość rzetelnych informacji na temat budowy chemicznej, właściwości fizykochemicznych, toksyczności, toksykokinetyki, losu w środowisku, brak legalnego, komercyjnego źródła substancji, wysokie ryzyko podczas prowadzenia badań, ale także dążenie do stosowania metod alternatywnych w toksykologii, skłoniły Doktoranta i Promotorów do podjęcia ważnego tematu.

Doktorant miał za zadanie oszacować toksyczność ostrą i wybrane aspekty losu środowiskowego grupy 17 nowiczków z wykorzystaniem narzędzi *in silico*.

Opis pracy, obejmujący rozdziały od czwartego do ósmego, przygotowany przez Doktoranta jest adekwatny pod względem jakościowym i ilościowym do tematu. Jest skondensowany i pozwala czytelnikowi zapoznać się z ogólną koncepcją i przebiegiem procesu badawczego. Nietrudno dostrzec, że Doktorant ze względu na wygodę, przygotował ten fragment rozprawy w dużej mierze w oparciu o tworzone wcześniej manuskrypty w języku angielskim. O ile język angielski jest językiem nauki, to przygotowując rozprawę w języku polskim, należałoby dołożyć starań, aby polskojęzyczny wstęp był napisany poprawną polszczyzną. Niestety w wielu miejscach natrafiłem na kalki językowe/anglicyzmy (strona 15. - „drogi toksyczności” od ang. *toxicity pathways*, „przepływ pracy” – od ang. *workflow*). Rozumiem, że wiele z anglojęzycznych terminów nie ma odpowiedników w języku polskim, ale w takim wypadku lepiej zastosować szerszy opis niż użyć kalki językowej lub bezpośredniego tłumaczenia. Przykład takiego niefortunnego zdania: „*Luki w danych (z ang. data gaps) są wypełniane za pomocą następującego elastycznego przepływu pracy (tłumaczenie z ang. „workflow”), w ramach którego tworzone są złożone kategorie, a niekompletne dane są szacowane poprzez podejście przekrojowe lub zastosowanie lokalnych QSAR*”. Anglojęzyczny termin „*data gaps*” w wielu miejscach Doktorant tłumaczy jako „luki danych” lub bardziej poprawnie „luki w danych”, ale czy nie lepiej byłoby po prostu zastąpić ten termin „brakiem danych” albo jak w powyższym zdaniu: „niekompletnymi danymi”. Poniżej wymieniam inne, wybrane, edytorskie niedociągnięcia, na które natknąłem się podczas lektury rozprawy:

- „manifestacji szeregu objawów” – propozycja: „wystąpienia szeregu objawów”,
- „są związkami fosforoorganicznymi zaprojektowanymi tak, aby były nieuleczalne i niewykrywalne” – propozycja: „są związkami fosforoorganicznymi zaprojektowanymi tak, aby były niewykrywalne a zatrucia nimi nieuleczalne”
- „Nadrzędnym problemem związków fosforoorganicznych z grupy Novichok jest znikoma ilość danych zawartych w literaturze naukowej” – propozycja: „Istotnym problemem jest znikoma ilość danych zawartych w literaturze naukowej na temat związków fosforoorganicznych z grupy Novichok”
- „utrzymują się one niezmiennie w środowisku” – propozycja: „utrzymują się niezmiennie w środowisku”
- „udowodniono skuteczność terapii butyrylocholinoesterazy” - powinno być „udowodniono skuteczność terapii butyrylocholinoesterazą”
- „Nie ma wątpliwości, że los tych niebezpiecznych substancji w środowisku jest znaczący, ale także trudny do określenia ze względu na ich toksyczność, a ma to niezaprzeczone znaczenie dla bezpieczeństwa człowieka” – co Doktorant rozumie jako znaczący?
- „okres półtrwania zakwalifikowano jako wolny” – okres półtrwania wyrażamy jednostkami czasu a nie szybkości.

Doktorant w rozdziale 5. przedstawił plan badawczy z kolejnymi etapami oraz postawił osiem pytań badawczych. W opinii Recenzenta lista pytań badawczych jest niepotrzebnie rozbudowana i rozdrobniona. W praktyce zostały oszacowane z wykorzystaniem dostępnych narzędzi *in silico* 1. wartości LD50 przy narażeniu drogą pokarmową u szczura oraz 2. wybrane parametry losu środowiskowego i one faktycznie zostały wskazane jako cele pracy. Pozostałe

pytania badawcze wprowadzają niepotrzebne zamieszanie, szczególnie jeśli skonfrontuje się je z wnioskami na stronie 27, które powinny odnosić się do wszystkich postawionych wcześniej pytań.

Komentarz szczegółowy. Pytanie badawcze numer 1 – „czy z powodzeniem można estymować wybrane parametry toksykologiczne dla środków paraliżujących typu Novichok przy użyciu metod *in silico*? Wg słownika języka polskiego PWN wyrażenie „z powodzeniem” oznacza 1. «z dobrym skutkiem, pomyślnie» 2. «z dużym prawdopodobieństwem». Które znaczenie Autor miał na myśli? W jaki sposób weryfikowana jest zdolność predykcyjna modeli *in silico* (*prawdopodobieństwo lub niepewność*)? Czy zamiarem była ocena sprawności działania programu komputerowego wykorzystującego model QSAR czy zgodność uzyskiwanego wyniku predykcji z wartością rzeczywistą?

Wspomniane tu pytanie badawcze 1. ma również powiązanie z pytaniem 8.: „*Które metody toksykologii in silico będą charakteryzowały się najwyższą wiarygodnością uzyskiwanych wyników w porównaniu do innych użytych?*”

We wnioskach znajdujemy następujące odpowiedzi: na pytanie pierwsze „z powodzeniem oszacowano toksyczność...” – jaka jest podstawa do takiego stwierdzenia? Na jakiej podstawie Doktorant stwierdził osiągnięcie „powodzenia”? Natomiast odpowiedź na pytanie 8.: „*Nie można jednoznacznie stwierdzić, który z zastosowanych modeli in silico cechował się najwyższą dokładnością uzyskiwanych wartości...*”

Niestety, pytanie 8. dotyczące wiarygodności i porównania narzędzi *in silico* pozostanie bez odpowiedzi. Bezwzględna weryfikacją jest konfrontacja wartości prognozowanych z eksperymentalnymi, których nie ma i prawdopodobnie długo nie będzie w domenie publicznej.

W rozdziale 6. Doktorant opisuje metodyczne aspekty przygotowania publikacji przeglądowych oraz charakteryzuje metody obliczeniowe *in silico*, wykorzystywane w toksykologii, skupiając się na narzędziach (QSAR Toolbox; Estimation Program Interface - EPI Suite oraz Toxicity Estimation Software Tool - TEST), które zastosował w swoich badaniach.

Rozdział 7. zawiera opis uzyskanych wyników i ich dyskusję.

Krótką charakterystyka publikacji wchodzących w skład rozprawy.

Praca I. Review of Possible Therapies in Treatment of Novichoks Poisoning and HAZMAT/CBRNE Approaches: State of the Art

To skondensowany przegląd dotychczas opublikowanych informacji nt. budowy chemicznej, toksyczności, przypadków zatruc oraz procedur stosowanych podczas leczenia zatruc. W publikacji przedstawiono także aspekty ochrony przed ekspozycją w okoliczności wypadku a także procedury dekontaminacji. Zasadniczo, w ostrych zatruciach postępowanie medyczne skupia się na określeniu rodzaju toksydromu, zastosowaniu dekontaminacji, usunięciu trucizny niezresorbowanej no i przede wszystkim podtrzymaniu funkcji życiowych. W ściśle określonych sytuacjach zastosowanie mają specyficzne odtrutki. Tak jest też w przypadku zatruc inhibitorami acetylocholinoesterazy. Ze względu na niewielką liczbę udokumentowanych zatruc nowiczkami, nie zidentyfikowano unikalnych dla tej grupy związków, skutecznych odtrutek, innych niż dla „klasycznych” inhibitorów. Autorzy opisują też stosowane procedury w sytuacjach skażenia

celowego lub przypadkowego, zwracając uwagę na działania organizacyjne, ochronne mające na celu zabezpieczenie ratowników i otoczenia i zapobiegając wtórnych zatruciom.

Podczas lektury zwróciłem uwagę na Paragraf 3.2. Supplies. Akapit jest niemal dosłownym cytatem z pracy nr 13: Haslam, J.D.; Russell, P.; Hill, S.; Emmett, S.R.; Blain, P.G. Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear Mass Casualty Medicine: A Review of Lessons from the Salisbury and Amesbury Novichok Nerve Agent Incidents. Br. J. Anaesth. 2022, 128, e200–e205., natomiast nie ma bezpośredniego odnośnika do tego źródła. Ponadto Doktorant błędnie parafrazował oryginał wskazując pirydynę „pyridine” jako odtrutkę a nie pralidoksym. Zdanie to nawet jeśli miało być rzeczywiście zacytowane, to powinno być zapisane w trzeciej a nie pierwszej osobie liczby mnogiej.

Można tę pracę traktować jako kompendium ogólnej wiedzy przydatne dla lekarzy czy wojskowych.

Praca II. What do we currently know about Novichoks? The state of the art.

W tej publikacji autorzy skupili się głównie na podsumowaniu wiedzy na temat właściwości fizykochemicznych, syntezy, mechanizmu działania oraz toksyczności nowiczoków. Podobnie jak poprzednia praca, stanowi ona cenne źródło informacji na temat tej tajemniczej grupy związków.

Lotność jest wielkością opisową, bezwymiarową, zazwyczaj wyrażana prężnością par lub temperaturą wrzenia. W tabeli 1. w tejże pracy znajdziemy zarówno lotność jak i prężność par oraz temperaturę wrzenia. Z czego wynika niska spójność pomiędzy tymi wartościami? Jakie kryteria opisowe przyjęli autorzy dla parametru lotność w poszczególnych pracach źródłowych? Nie znalazłem komentarza nt. tych niezgodności w publikacji.

Praca III. The prediction of hydrolysis and biodegradation of Novichoks using in silico toxicology methods oraz IV. Application of toxicology in silico methods for prediction of acute toxicity (LD50) for Novichoks

Te dwie prace stanowią zasadniczy rdzeń rozprawy i skupiają się na przewidywaniu toksyczności ostrej oraz hydrolizy i biodegradacji nowiczoków z wykorzystaniem narzędzi opartych na modelach QSAR. W tej stosunkowo nielicznej grupie związków badanych, prognozowana podatność na degradację była bardzo zróżnicowana, od bardzo łatwo ulegających rozkładowi (np. A-230, A-234) po stabilne w środowisku (np. C01A035).

To czego w obu pracach zdecydowanie mi zabrakło, to szerszego omówienia modeli QSAR i postępowania krok-po-kroku, co pozwoliłoby prześledzić cały proces wykorzystania użytych narzędzi. Kluczowym zagadnieniem podczas korzystania z modeli QSAR jest weryfikacja czy badane cząsteczki chemiczne należą do dziedziny zastosowania (ang. *applicability domain*) danego modelu. W jaki sposób weryfikowano przynależność substancji badanych do dziedziny zastosowania oraz ile indywidualnych substancji znajdowało się w zbiorze uczącym? Czy Doktorant próbował wyjaśnić jakie deskryptory molekularne opisujące budowę cząsteczki, właściwości fizyko-chemiczne wpływają na szacowane parametry? Wsparcie prognoz tworzonych za pomocą modelu QSAR przez mechanistyczne wyjaśnienie zależności pomiędzy obecnością określonych struktur (charakterystyką deskryptorów) a kierunkiem/siłą działania biologicznego uwiarygadnia uzyskane wyniki. Temu zagadnieniu Doktorant poświęcił względnie mało uwagi

zarówno w publikacjach jak i omówieniu wyników w rozprawie (namiastkę takich rozważań można znaleźć w dyskusji, w pracy III.).

Z pewnością rozwój modeli obliczeniowych do przewidywania aktywności biologicznej to kierunek, w którym aktualnie zmierzamy, starając się realizować w pełni zasady 3R. Techniki obliczeniowe pozwalają nie tylko wyeliminować lub zmniejszyć liczbę zwierząt wykorzystywanych w naukach biomedycznych, ale zaoszczędzić czas i środki finansowe, kosztem względnie dużej, ale akceptowalnej niepewności wyników. Coraz więcej dostępnych narzędzi charakteryzuje się wystarczającymi parametrami wiarygodności i dzięki temu wyniki prognoz są akceptowane przez instytucje regulacyjne.

Podsumowując, Doktorant wykorzystując dostępne narzędzia oparte na modelach QSAR przeprowadził prognozowanie toksyczności ostrej u szczurów i losu w środowisku 17 nowiczków. Ze względu na specyfikę tej grupy związków: wysoką toksyczność, komercyjną niedostępność substancji wzorcowych oraz brak rzetelnych informacji na temat ich struktury i właściwości, podjęty temat rozprawy uważam za uzasadniony. Wykorzystane narzędzia *in silico* są uznane przez instytucje regulacyjne za odpowiednie do celów, z którymi mierzył się Doktorant. Wymienione przeze mnie niedociągnięcia edytorskie oraz zgłoszone uwagi merytoryczne i zapytania mają przede wszystkim wzbudzić w Doktorancie potrzebę dalszego doskonalenia warsztatu badawczego, ale także być punktem wyjścia do dyskusji podczas publicznej obrony.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Macieja Nogi spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom na stopień doktora i w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pana mgr. inż. Macieja Nogi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

