

Dr hab. n. med. Waldemar Machała
Prof. nadzw. Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik

Łódź, dn. 01 sierpnia 2023 r.

Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii

Centralny Szpital Kliniczny

92-213 Łódź

ul. Pomorska 251

tel. (42) 201 42 10

fax: (42) 201 42 11

e-mail: waldemar@machala.info

waldemar.machala@umed.lodz.pl

Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 201 42 10

O C E N A R O Z P R A W Y D O K T O R S K I E J

mgr inż. Macieja Nogi na temat:

„Badania wybranych parametrów toksykologicznych dla związków fosforoorganicznych z grupy Novichok przy użyciu metod toksykologii in silico”

Recenzja zlecona pismem
Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytetu Rzeszowskiego,
INM 175/23
dn. 12 lipca 2023 r.

W codziennym życiu znajdują się liczne substancje chemiczne, które w przypadku uwolnienia, niezależnie od mechanizmu ich działania wpływają niekorzystnie na zdrowie. Szczególne znaczenie w obecnych uwarunkowaniach polityczno-wojskowych nabiera potencjalne użycie broni masowego rażenia związane z działaniami terrorystycznymi, do których zaliczany jest terroryzm chemiczny.

Okoliczności w których może pojawić się zagrożenie skażenia substancją chemiczną w trakcie których dochodzi do uwolnienia toksycznych substancji mogących stanowić zagrożenie zdrowia i życia ludzi obejmuje min: awarie w fabrykach produkujących, stosujących, przetwarzających niebezpieczne substancje chemiczne, działania jednostek wojskowych z użyciem toksycznych substancji chemicznych, ale również akty terrorystyczne.

W 2018 roku w atakach terrorystycznych została użyta nowa grupa środków paralityczno-drgawkowych, określana mianem związków serii A zwana Nowiczokami (np. A-234). Nadrzędnym problemem związków fosforoorganicznych z grupy Novichok jest znikoma ilość danych zawartych w literaturze dotyczących struktury, właściwości fizycznych i chemicznych, toksyczności czy też losu środowiskowego tych związków, a zatem **cel przedłożonej rozprawy doktorskiej** zakładający określenie wybranych parametrów toksykologicznych dla związków

fosforoorganicznych z grupy Novichok (n=17) przy wykorzystywaniu metod toksykologii *in silico* należy uznać za bardzo interesujący.

Przedstawiona rozprawa zawiera 28 stron maszynopisu (w tym cztery tabele; dwie ryciny). Układ pracy o zachowanych proporcjach, składa się ze wstępu, celu pracy, przedmiotu badań (materiału i metod), prezentacji wyników, wniosków, bibliografii obejmującej 49 pozycji, streszczeń w języku polskim i angielskim.

Doktorant umieścił również: wykaz skrótów użytych w pracy, co ułatwia zapoznanie się z treścią rozprawy doktorskiej, oświadczenia współautorów o ich wkładzie w przygotowaniu 4 publikacji, które zostały dodatkowo dołączone do dysertacji, tj:

1. Noga M, Jurowski K: What do we currently know about Novichoks? The state of the art, Archives of Toxicology 97, 651–661. (2023). <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03437-5>
2. Noga M, Michalska A, Jurowski K: Review of Possible Therapies in Treatment of Novichoks Poisoning and HAZMAT/CBRNE Approaches: State of the Art, J. Clin. Med. 2023, 12(6), 2221; <https://doi.org/10.3390/jcm12062221>
3. Noga M, Michalska A, Jurowski K: Application of toxicology *in silico* methods for prediction of acute toxicity (LD50) for Novichoks, Archives of Toxicology, 97, 1691–1700 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03507-2>
4. Noga M, Michalska A, Jurowski K: The prediction of hydrolysis and biodegradation of Novichoks using *in silico* toxicology methods. Science of The Total Environment, 890, 164241. (2023). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164241>

Wstęp, napisany w oparciu o poprawnie dobrane piśmiennictwo, pozwalające na usystematyzowanie faktów dotyczących zagadnień będących przedmiotem rozprawy, logicznie wprowadza czytelnika w jasno sprecyzowany cel pracy, któremu doktorant przypisał następujące etapy badań:

1. Przegląd literatury naukowej z wykorzystaniem wyszukiwarek naukowych (PubMed, Google Scholar, Scopus) oraz baz toksykologicznych (PubChem, CompTox Chemicals Dashboard oraz ECHA) w celu pozyskania danych z przeprowadzonych estymacji oraz znalezienia odpowiednich luk danych.
2. Wyznaczenie parametrów toksykologicznych, tj. toksyczności ostrej (medialna dawka śmiertelna, LD₅₀).
3. Wyznaczenie parametrów istotnych z punktu widzenia toksykologii środowiska, tj. hydroliza (czasu półtrwania hydrolizy, stałej szybkości hydrolizy) oraz biodegradacji, co pozwoli określić, przez jaki czas związki te będą stanowiły zagrożenie dla ludzi po bezpośrednim kontakcie ze środowiska.

W rozdziale rozprawy doktorskiej „**Materiał i metody**” Doktorant bardzo szczegółowo opisał proces zbierania danych dotyczących związków typu Novichoc przy użyciu wyżej

opisanych wyszukiwarek naukowych (cel) oraz stosując różne kombinacje następujących terminów w języku angielskim: Novichok; środki paralizujące; związki serii A; Mirzayanov; Sergei Skripal; Alexei Navalny; związki fosforoorganiczne; A-230; A-232; A-234; *N*-[etoksy(-fluoro)fosforylo]-*N,N*-dietyloetanoimidamid; HAZMAT; CBRN.

Właściwości związków Novichok, takie jak toksyczność oraz los środowiskowy określano stosując podejście *in silico*, ilościową zależność struktura-aktywność (QSAR, *ang. Quantitative Structure-Activity Relationship*).

Do estymacji parametrów medialnej dawki śmiertelnej (LD₅₀), biodegradacji, okresu półtrwania hydrolizy oraz stałej szybkości hydrolizy wykorzystano oprogramowanie takie jak: pakiet aplikacji QSAR Toolbox, Estimation Program Interface (EPI) Suite oraz Toxicity Estimation Software Tool (TEST).

W przypadku pakietu EPI Suite wykorzystano poszczególne modele celem prognozy właściwości fizycznych, chemicznych i losów środowiskowych: KOWWIN; HENRYWIN; MPBWIN; BIOWIN; WATERNT; HYDROWIN (szczegółowy opis w dysertacji).

Doktorant przedstawił wyniki w sposób czytelny, w tabelach, rycinach i tekście dysertacji.

Wyniki rozprawy wykazały, że:

1. Według wykonanych estymacji **najniebezpieczniejszym badanym związkiem** z grupy Bojowych Środków Trujących (BST) ($n=17$) jest związek typu Novichok A- 232. Medialna dawka śmiertelna (LD₅₀) oszacowana dla tego związku przy użyciu oprogramowania QSARToolbox wyniosła 0,41 mg/kg mc.
2. Najwyższe wartości ostrej toksyczności, **czyli najmniej toksyczne**, osiągnęły związki serii A: irański 'Novichok oraz C01-A038. Medialna dawka śmiertelna (LD₅₀) oszacowana dla tych związków przy użyciu oprogramowania QSARToolbox wyniosła odpowiednio: 130,69 mg/kg mc i 166,13 mg/kg mc.
3. Jedynymi związkami, których wartości LD₅₀ według wykonanych estymacji wykazały podobieństwo do dostępnych danych literaturowych nt. toksyczności związków typu Novichok są: A-230; A-232 i irański: Novichok.
4. Żadna z estymowanych wartości LD₅₀ wszystkich badanych BST z grupy Novichok nie przewyższała konwencjonalnych środków trujących – związku VX oraz GD.
5. Stosując model ekspercki Biowin3 szacujący czas niezbędny do pierwotnej i ostatecznej biodegradacji tlenowej w wodzie ustalono, iż wszystkie badane związki Novichok potrzebowały okresu tygodni do miesięcy, aby całkowicie zdegradować, wyjątek stanowiły struktury: A-230; A-242 (Novichok 5); C01-A037 i C01-A041, które do całkowitej biodegradacji wymagały tygodni.
6. Biorąc pod uwagę kryterium łatwej biodegradowalności (czas niezbędny do biodegradacji wynosi „tygodnie” lub szybciej, a prawdopodobieństwo modelu Biowin5 wynosi $>0,5$) tylko dwa związki typu Novichok spełniały w/w kryterium, tj. A-230 i A242.
7. Estymowany okres półtrwania oraz stała szybkości hydrolizy wykazały, iż najszybciej hydrolizującymi związkami typu Novichok są: A-230; A-242 oraz irański

Novichok; okres półtrwania hydrolizy liczony w godzinach wynosił odpowiednio: dla pierwszych dwóch związków ok 5 h, natomiast dla irańskiego Novichok ponad 9 h.

8. W grupie analizowanych BŚT (n=17), do związków typu Novichok, które mogą być obecne w środowisku przez ponad miesiąc należały: A-232; A-234; A-262 i C01A043; C01A045.
9. W grupie analizowanych BŚT (n=17), do związków które mogą być obecne w środowisku nawet kilka lat należą związki typu Novichok: C01A035; C01-A036; C01-A037; C01-A038; C01-A039; C01-A040; C01-A041; C01-A042.

Dyskusja przeprowadzona w sposób uporządkowany i logiczny w przedłożonych publikacjach świadczy o dużej wiedzy autora o poruszanych zagadnieniach.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant sformułował korespondujące z celami pracy **wnioski**.

1. Z powodzeniem oszacowano toksyczność ostrą poprzez estymację medialnej dawki śmiertelnej (szczur, podanie doustne) różnymi metodami toksykologii.
2. Wyestymowano z pełnym powodzeniem parametry hydrolizy (okres półtrwania, stała szybkości) oraz dokonano prognozy biodegradacji dla związków Novichok stosując różnorodne metody *in silico* bazujące na podejściu (Q)SAR (ilościowa zależność struktura-aktywność).
3. Najniższą medianę dawki śmiertelnej (LD50 podanie doustne, człowiek) wyestymowano dla związków Novichok A -232 (0,41 mg/kg mc); A-230 (0,50 mg/kg mc) oraz A-234 (0,63 mg/kg mc), przy założeniu, że statystyczny człowiek waży ok 70 kg.
4. Środki paraliżujące Novichok nie przewyższają toksycznością ostrą znanych dotychczas konwencjonalnych bojowych środków trujących serii -V oraz - G. A-232 osiągnął najniższą wartość LD50 (0,41mg/kg) ze wszystkich badanych struktur Novichok; nie przewyższa jednak toksycznością związków takich, jak, VX (0,1 mg/kg mc.) czy Soman (0,06 mg/kg mc).
5. Stabilność związków Novichok jest różnorodna w zależności od zastosowanego związku fosforoorganicznego; mogą być obecne w środowisku zewnętrznym od kilku godzin (A-230, A242 i irański „Novichok”), przez ponad miesiąc (A-232, A-234, A-262 i C01A043- C01A045) nawet kilka lat (C01A035-C01A042).
6. Związki struktury A ulegają biodegradacji tlenowej oraz beztlenowej; dla wszystkich badanych struktur typu Novichok ramy czasowe ostatecznej biodegradacji wahały się od tygodni dla struktur A-230, A-242, C01-A037 i C01-A041, a także okresu tygodni do miesięcy dla reszty analizowanych związków fosforoorganicznych.
7. Nie można jednoznacznie stwierdzić, który z zastosowanych modeli *in silico* cechował się najwyższą dokładnością uzyskanych wartości; wszelkie użyte oprogramowania

specjalistyczne były zalecane przez organy regulujące i uzupełniały się wzajemnie pod względem różnych funkcji estymacyjnych oraz weryfikowały obustronnie.

Uwagi krytyczne

1. Strona 20 – w przedłożonej dysertacji „według estymacji najniebezpieczniejszym badanym związkiem typu Novichok jest A-232, w przeciwieństwie do wartości obliczonych przez Carlsen^{a 30}, gdzie środek paraliżujący A-242 miałby być najbardziej toksyczny” – *proszę o wyjaśnienie możliwych przyczyn stwierdzonej różnicy w wyliczonych wartościach LD₅₀.*
2. Strona 22 – w dysertacji zaznaczono „spośród wszystkich zbadanych struktur Novichok (n=17) tylko A-230 (1) oraz A-242 (4) przekroczyły wartości modelu Biowin 5 > 0,5 (oszacowane prawdopodobieństwo jest łatwo biodegradowalne). Z kolei stronie 21 dysertacji „model Biowin1 oszacował biodegradację jako szybką dla 10 z 17 badanych związków Novichok” – *proszę o wyjaśnienie przyczyny różnicy w ilości środków paraliżujących ulegających biodegradacji pomiędzy modelem Biowin5 a Biowin1.*
3. Strona 24 – w dysertacji zaznaczono, iż „Okres półtrwania hydrolizy oszacowany przez Carlsen^{a 30} został określony dla związków 2, 3 i 5 jako umiarkowany (10-30 dni). Wyniki nie korelują; dla związków serii A:2, 3, 5, 15-17, okres półtrwania zakwalifikowany jako wolny (30-100)” - *zdaniem recenzenta byłoby ciekawe uzupełnienie informacji z czego wynikają różnice w oszacowanej liczbie dni.*
4. Strona 27 – rozdział 8. Wnioski: *błąd w przypisaniu wartości LD₅₀ dla związku Novichok A 232 – jest 0,50 mg/kg mc – powinno być 0,41 mg/kg mc.*

Rozprawa doktorska mgr inż. Macieja Nogi została pozytywnie oceniona przez recenzenta i spełnia warunki określone w art. 187, Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce.

Podjęcie bardzo istotnej tematyki badawczej, nakład pracy wykonanej przez doktoranta, jego wiedza z dziedziny, którą wykazał w dysertacji oraz umiejętność posługiwania się warsztatem naukowym w pełni upoważniają mnie do wystąpienia do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr. inż. Macieja Noga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter dysertacji - autor analizuje hydrolizę oraz biodegradację związków typu Novichok celem oceny stabilności w/w związków w środowisku, a co za tym idzie – oceny bezpieczeństwa w odniesieniu do narażonych ludzi wnioskuje o wyróżnienie pracy.

KIEROWNIK
Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii
Centrum Szpitala Klinicznego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
W. deleder
mgr inż. i med. prof. nadzw. Waldemar Machala

