

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka

KIEROWNIK KATEDRY BIOCHEMII MOLEKULARNEJ

Gdańsk, dnia 15 kwietnia 2019 roku

**Recenzja dorobku naukowego dr. Henryka Myszki,
ze szczególnym uwzględnieniem osiągnięcia naukowego pt. „Synteza, ustalenie budowy i
badania właściwości biologicznych glikozaminozydów diosgenylu” stanowiącego
podstawę postępowania habilitacyjnego**

Recenzję przedstawiam na prośbę Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego realizującego postanowienie Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów z dnia 07.03.2019 r. (pismo nr BCK-V-L-9458/18) na podstawie otrzymanego w formie elektronicznej (CD ROM) kompletu dokumentów. Stwierdzam, iż materiały zostały przygotowane zgodnie z wymogami formalnymi, umożliwiając ocenę dorobku naukowego Kandydata, w tym jednotematycznego cyklu publikacji nazwanego przez Kandydata osiągnięciem naukowym.

Sylwetka Kandydata. Dr Henryk Myszka ukończył w roku 1982 studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, a 5 lat później za pracę doktorską pt. „Budowa i właściwości produktów reakcji chlorków O-acetylo-2-deoksy-2-nitrozo-D-glikopiranozyli z pirazolem i pochodnymi hydroksyaminokwasów”, uzyskał na tym samym wydziale, zgodnie z ówczesnymi uregulowaniami prawnymi, stopień naukowy doktora nauk chemicznych w zakresie chemii organicznej (chemia cukrów). Promotorem rozprawy był prof. Zygfryd Smiatacz, z którym Kandydat współpracował naukowo do czasu przejścia Profesora na emeryturę w roku 1989. Od początku aktywności naukowej, poza badaniami fizykochemicznymi pochodnych amin heterocyklicznych realizowanymi w ramach pracy magisterskiej, zainteresowania Kandydata koncentrują się na chemicznej syntezie pochodnych cukrów. Kariera zawodowa Habilitanta zatrudnionego od 1986 roku na stanowisku naukowo-

technicznym związana jest, poza stażem podoktorskim (1989 – 1991) odbytym w Instytucie Farmakologii, Uniwersytet Tennessee w Memphis (USA), z jednym miejscem pracy – Uniwersytetem Gdańskim, początkowo był to Instytut, a po reorganizacji Wydział Chemii. Przeszedł tu poszczególne etapy kariery nauczyciela akademickiego od asystenta (1987), adiunkta (1991) po, nietypowo dla kandydata do stopnia dr. hab., starszego wykładowcy (2010).

Dorobek naukowy. Dr Myszka jest autorem lub współautorem 24 prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR . Ich sumaryczna wartość współczynnika wpływu wynosi ponad 48. Dane bibliometryczne dorobku naukowego Kandydata przedstawiają się następująco: indeks h 8, liczba cytowań bez autocytowań 169 (dane wg bazy WoS z 12/04/19). Trzy z tych prac ukazały się drukiem przed uzyskaniem przez Habilitanta stopnia naukowego doktora. Dorobek naukowy Kandydata uzupełniają dwa artykuły przeglądowe, które ukazały się w czasopiśmie krajowym (Wiadomości Chemiczne), dwa zgłoszenia patentowe (brak informacji o uzyskaniu patentów) oraz kilkadziesiąt komunikatów prezentowanych na zjazdach krajowych i międzynarodowych. Kilka z nich Habilitant prezentował w formie wystąpień ustnych (łącznie 10), w tym podczas zjazdów Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Dorobek naukowy Kandydata spełnia zwyczajowe wymogi stawiane kandydatom do stopnia naukowego dr. hab. we wnioskowanej dyscyplinie naukowej. Tę pozytywną ocenę obniża fakt, iż obejmuje on 35 lat aktywności naukowej Habilitanta. W tym kontekście także liczbę cytowań uznać należy za umiarkowaną, niemniej ponad 60% cytowań przypada na cykl prac wchodzących w zakres sięgnięcia naukowego, co z kolei oceniam pozytywnie. Większość prac Kandydata ukazała się w specjalistycznych czasopismach dedykowanych badaniom nad węglowodanami, które skierowane są węższego grona odbiorców. Fakt ten ma istotny wpływ na przedstawione powyżej wyniki analizy bibliometrycznej. Osiągnięcie habilitacyjne stanowiące monotematyczny cykl publikacji reprezentuje wysoki poziom merytoryczny. Habilitant pełnił też funkcję recenzenta prac zgłaszanych do czasopism z listy JCR. Świadczy to o Jego rozpoznawalności w środowisku naukowym.

Ocena dorobku naukowego niewłączonego do jednotematycznego cyklu publikacji. Ta część dorobku naukowego Habilitanta pochodzi z lat 1982 – 2018 i obejmuje 13 prac oryginalnych, które ukazały się w czasopismach z listy JCR (wartości IF z przedziału 6,47 – 0,14) o średniej wartości IF nieco ponad 2. Problematyka badań, poza prowadzonymi w ramach pracy magisterskiej, koncentrują się na chemicznej syntezie i badaniu struktur pochodnych monosacharydów (metodą magnetycznego rezonansu jądrowego, analiza rentgenostrukturalna oraz konformacyjna z wykorzystaniem modelowania molekularnego). Obiektami badań były glikozydy pirazolu, glikozydy estrów metylowych L-hydroksyaminokwasów, glikozydów

diosgenyłu oraz β -D-glukopiranozydu flawonyłu. Z załączonych oświadczeń wynika, że podstawowe zadania Kandydata skupiały się na aspektach syntetycznych oraz oczywiście dyskusji uzyskanych wyników.

Ocena aktywności zawodowej. Badania prowadzone przez Kandydata finansowane były głównie z funduszy macierzystej uczelni. Podkreślić jednak należy, że dr Myszka był kierownikiem zadania naukowo-badawczego w 5-letnim (2010 – 2014) grantie NCBiR. Jego problematyka obejmowała badania wchodzące w zakres osiągnięcia habilitacyjnego. Zaproszenie do udziału w konsorcjum realizującym duży projekt świadczy o rozpoznawalności Kandydata w środowisku polskich badaczy zajmujących się chemią węglowodanów. Habilitant nie pełnił (brak informacji czy aplikował) funkcji kierownika projektów naukowych finansowanych z innych źródeł zewnętrznych. Uczestniczył natomiast bardzo aktywnie w realizacji projektów związanych z kształceniem i aktywnością studentów.

Kandydat prowadził bądź prowadzi wszystkie typy zajęć obejmujące wykłady, ćwiczenia audytoryjne i laboratoryjne z chemii ogólnej i nieorganicznej dla studentów macierzystego wydziału oraz Wydziału Biologii UG, sprawował opiekę nad 14 dyplomantami i 26 magistrantami, pełni funkcję promotora pomocniczego w jednym przewodzie doktorskim. Jest też współautorem 5 skryptów z chemii ogólnej i nieorganicznej. Dr Myszka bardzo aktywnie uczestniczy w wydarzeniach upowszechniających naukę, jest opiekunem Naukowego Koła Chemików (NKCh). Warto podkreślić, że 6 kwietnia br. podczas III edycji Festiwalu Pokazów Chemicznych w Toruniu, NKCh wygrało tegoroczną edycję. Do duże osiągnięcie, w którym udział miał Habilitant. Dr H. Myszka jest bardzo zaangażowany w działalność organizacyjną uczelni. Na Wydziale Chemii pełnił funkcję Prodziekana ds. Studenckich (2002-2008), był też członkiem szeregu komisji uczelnianych, głównie związanych z kształceniem studentów oraz Senatu UG. Aktywnie działa na rzecz środowiska naukowego, w tym między innymi w Polskim Towarzystwie Chemicznym (sekretarz Oddziału Gdańskiego PTChem w latach 2010-2015, sekretarz 58. Zjazdu Polskiego Towarzystwa Chemicznego.). Za swoją aktywność organizacyjną był wielokrotnie wyróżniany nagrodami Rektora UG. W podsumowaniu stwierdzam, że ten aspekt aktywności zawodowej Kandydata zasługuje na szczególnie wysoką ocenę. Umiejętność, a przede wszystkim chęć pracy na rzecz otoczenia dowiodzi Jego rzetelnego podejścia do obowiązków zawodowych, o czym mogłem się wielokrotnie przekonać jako członek tej samej społeczności.

Ocena osiągnięcia naukowego zgłoszonego przez Kandydata do postępowania habilitacyjnego.

Wyniki stanowiące podstawę wniosku zawarte są w 8 pracach oryginalnych, które ukazały się w czasopiśmie z listy JCR. Dorobek uzupełniają 2 prace przeglądowe opublikowane w

czasopiśmie spoza tej listy (Wiadomości Chemiczne). Poza jednym, współczynniki wpływu pozostałych czasopism indeksowanych na liście JCR, w których ukazały się prace przekraczają 2, a ich sumaryczna wartość IF wynosi ponad 17. Publikacje te ukazały się w latach 2002 – 2017, a ich łączna liczba cytowań to 102. Większość prac cyklu spotkała się z dobrą recepcją ze strony środowiska naukowego, co świadczy o dużej wartości uzyskanych wyników. W czterech z tych prac, a także w pracach przeglądowych, Habilitant był autorem korespondującym. Fakt ten wsparty oświadczeniami Kandydata i współautorów publikacji dowodzi, że pełnił On rolę wiodącą w prezentowanych badaniach.

W przedstawionym do oceny osiągnięci habilitacyjnym obiektem badań była saponina będąca glikozydem steroidowym. Jej część cukrową stanowi reszta D-glukozy, a aglikonem (sapogeniną) diosgenina – steroid występujący w roślinach, w tym rodzaju *Dioscorea*. Inspiracją do podjęcia badań przed Kandydata były znane od dawna właściwości przeciwnowotworowe ekstraktów roślinnych zawierających między innymi glikozyd diosgenyłu. Wykorzystując swoje doświadczenia w zakresie chemicznej syntezy pochodnych cukrów, a także doniesienia literaturowe, dr Myszkowski zaprojektował i przeprowadził syntezę serii analogów tej saponiny, w których fragment cukrowy stanowiły pochodne *N*-modyfikowanej D-glukozaminy.

Punktem wyjścia w prowadzonych badaniach była synteza 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu. W pierwszej z prac (**H1**) znajduje się opis alternatywnych, z wykorzystaniem dwóch różnych osłon grupy aminowej (trifluoroacetylową lub tetrachloroftaloidalową), ścieżek syntetycznych tego związku. W wyniku reakcji bromków *N*-chronionych pochodnych D-glukozaminy z diosgeniną, stosując triflan srebra jako promotor reakcji kondensacji, otrzymał pożądaną produkt. Jego strukturę jednoznacznie potwierdziły wyniki analizy struktury przeprowadzone metodami ^1H i ^{13}C NMR oraz rentgenostrukturalnej (pochodna zawierająca ugrupowanie *N*-tetrachloroftalimidowe) (**H2**).

Obiecujące wyniki aktywności cytotoksycznej otrzymanej saponiny wobec komórek nowotworowych limfocytów stanowiły solidną argument dla kontynuowania prac. Przeprowadzone kilka lat później pogłębione badania aktywności biologicznej 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu pokazały, że nie wykazuje on działania cytotoksycznego wobec komórek nowotworowych płuc, wykazały natomiast, że posiada duży potencjał jako związek o działaniu przeciwbakteryjnym. Badania przeprowadzone na szczepach referencyjnych bakterii oraz pochodzących od pacjentów leczonych szpitalnie wykazały, że jego aktywność bakteriostatyczna i bakteriobójcza zbliżona jest to powszechnie stosowanych antybiotyków z jednocyfrowymi wartościami MIC i MBC dla niektórych z badanych szczepów. Na szczególne

pokeślenie zasługuje fakt synergicznego działania badanego glikozydu diosgenyłu z wankomycyną i daptomycyną wobec szczepów metycyliny- i wankomycyno-wrażliwych.

W kolejnej pracy (**H3**) opisano trzy nowe glikozydy diosgenyłu zawierające podstawniki przy grupie aminowej (pochodna 2-fenylomocznika, grupy acetylowa i trifluoroacetylowa). W ich syntezie wykorzystano wcześniej opracowane metody, a pochodną mocznika otrzymano w reakcji grupy aminowej glukozoaminy z izocyjanianem fenylu. Przeprowadzone badania biologiczne na komórkach nowotworowych limfocytów wskazują, że saponiny podane łącznie z kładrybiną (cytostatyk stosowany w terapii przeciwnowotworowej) obniżają liczbę komórek nowotworowych. Wyniki te spotkały się ze znacznym zainteresowaniem środowiska naukowego, a publikacja, w której je opisano była cytowana 56 razy.

Kolejne prace cyklu (**H7 i H8**) prezentują wyniki badań nad optymalizacją syntezy glikozydów diosgenyłu. Podstawnik przy atomie C-2 reszty glukozy pełni również rolę tzw. grupy uczestniczącej w procesie tworzenia wiązania glikozydowego, ma więc wpływ na geometrię tego wiązania. Kandydat postanowił porównać efektywność syntezy otrzymanego wcześniej glikozydu diosgenyłu wykorzystując do ochrony grupy aminowej cztery grupy ochronne: trifluoroacetamidową, trichloroetoksykarbonyloaminową, ftalimidową i tetrachloroftalimidową. Modyfikacje obejmowały również kolejność prowadzenia i usuwania osłon grup hydroksylowych, warunki ich usuwania, a także grupy odchodzące przy anomerycznym atomie węgla (chlorki, bromki D-glukozaminopiranozyłu oraz pochodne iminoeterowe). W zależności od obranej taktyki, różna była wydajność poszczególnych etapów syntezy oraz stosunek tworzących się anomerów α i β . W wyniku prowadzonych optymalizacji najkorzystniejsze okazało się zastosowanie donorów glikozyłu z grupami ftalimidową i tetrachloroftalimidową oraz prowadzenie reakcji tworzenia wiązania glikozydowego w dichlorometanie, dodając halogenkowy donor glikozydu do roztworu diosgeniny i triflanu srebra.

W ramach badania zależności struktura – aktywność otrzymano, poprzez redukcyjne alkilowanie grupy aminowej, serię dziesięciu *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych pochodnych aminoglikozydu diosgenyłu (**H8**). Związki te przebadano pod kątem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej na szczepach bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz dwóch gatunkach drożdżaków. Największą aktywność przeciwgrzybową wykazała wyjściowa saponina (z protonowaną grupą aminową). Wszystkie z badanych związków hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich. Najniższe (dla wybranych szczepów jednocyfrowe) wartości MIC oznaczono dla pochodnych z grupą *N*-metylową i *N*-etylową. Wszystkie związki okazały się

nieaktywne w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. To bardzo ciekawy wynik wskazujący na ich działanie selektywne. *N,N*-Dialkilowe pochodne 2-amino-2-deoksy-D-glukopiranozydu diosgenyłu poddano badaniom wobec czterech szpitalnych szczepów grzybów gatunku *non-albicans Candida* (**H9**). Dla wszystkich z badanych związków najniższe wartości MIC wyznaczono wobec gatunków *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. Były one zbliżone, a w niektórych wypadkach nawet niższe niż stosowanych antybiotyków. Największą aktywność przeciwgrzybową wobec *C. parapsilosis* wykazała saponina z grupą *N,N*-dimetyloaminową w pozycji C-2. Wszystkie z badanych związków nawet w stężeniach kilkakrotnie wyższych od wartości MIC, nie przejawiały aktywności hemolitycznej. To kolejny dowód, że zaprojektowane przez Habilitanta glikozydy diosgenyłu należy ocenić jako potencjalnie atrakcyjne środki terapeutyczne.

W ostatniej pracy z monotematycznego cyklu (**H10**) opisano syntezy i badania przeciwdrobnoustrojowe serii dziewięciu 2-amino-2-deoksy-D-galaktopiranozydów diosgenyłu różniących się podstawnikiem przy grupie aminowej reszty cukru. Obecne są tu zarówno ugrupowania: acetylowe, trifluoroacetylowe, ureinowe, mono- i dialkilowe. Generalnie, w porównaniu do odpowiednich pochodnych glukozydów, zmiana konfiguracji węgla C-4 pierścienia cukrowego nie doprowadziła wzrostu aktywności lub selektywności. Niemniej także w tej serii związków niektóre z wyznaczonych wartości MIC wobec bakterii Gram-dodatnich i grzybów przyjmowały wartości jednocyfrowe, świadczące o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Cennym uzupełnieniem badań własnych Kandydata są dwie prace przeglądowe, w których Habilitant wraz z doktorantką omawia metody osłony grupy aminowej stosowane w syntezie pochodnych D-glukozoaminy (**H5**) oraz dokonuje charakterystyki (budowa, właściwości, chemiczne syntezy) saponin steroidowych (**H6**). Problematyka obu artykułów nawiązuje bezpośrednio do badań opisanych w monotematycznym cyklu prac przedstawionym jako osiągnięcie habilitacyjne. Obie prace prezentują wysoki poziom merytoryczny. Przekonują, że Kandydat jest ekspertem w zakresie chemicznej syntezy pochodnych cukrów.

Wysoko oceniam wartość merytoryczną osiągnięcia naukowego. Habilitant zaprojektował struktury kilkudziesięciu glikozydów diosgenyłu oraz ścieżki ich syntezy. Następnie wraz ze współpracownikami, zsyntetyzował i określił ich struktury przestrzenne. Przeprowadzone badania biologiczne, szczególnie ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej, pozwoliły Kandydatowi na dokonanie oceny wpływu wprowadzonych modyfikacji do bazowego glikozydu diosgenyłu na aktywność biologiczną. Duża część z syntetyzowanych związków charakteryzuje się niskimi wartościami (zbliżonymi

do powszechnie stosowanych antybiotyków) wartościami MIC. Wyniki te są bardzo interesujące, zostały zauważone przez międzynarodowe środowisko naukowe. Bez wątpienia uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w intensywnie rozwijane w ostatnich latach, badania nad poszukiwaniem nowych związków o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej, co związane jest z gwałtownym rozwojem oporności, będącej efektem nadmiernego stosowania farmaceutyków. Z tego powodu opracowanie nowych chemioterapeutyków o tym profilu aktywności jest jednym z największych wyzwań chemii medycznej dwudziestego pierwszego wieku. W nurt tych badań znakomicie wpisuje się osiągnięcie habilitacyjne Kandydata. Pewien niedosyt budzi natomiast wąski zakres badań biologicznych syntetyzowanych związków, ograniczający się do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej, cytotoksycznej i hemolitycznej. Na ich podstawie trudno ocenić rzeczywisty potencjał syntetyzowanych saponin. Uzyskane wyniki to efekt współpracy Habilitanta z kilkoma grupami badawczymi kierowanymi przez profesorów: Wiesława Kacę (instytut Biologii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach), Zbigniewa Ciunika (Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski), Wojciecha Kamysza (Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej, Gdański Uniwersytet Medyczny) oraz Beatę Liberek z macierzystej jednostki. Umiejętność współpracy z partnerami zewnętrznymi to niezbędna cecha współczesnego badacza zajmującego się problematyką interdyscyplinarną. Ten aspekt aktywności Habilitanta oceniam pozytywnie.

Konkluzja. Stwierdzam, że dr Henryk Myszka przedstawił wartościowe i oryginalne osiągnięcie habilitacyjne. Uzyskane wyniki spotkały się z dobrą recepcją ze strony międzynarodowego środowiska naukowego. Także inne aspekty aktywności zawodowej, w tym działalność dydaktyczna oraz wyjątkowa aktywność organizacyjna Habilitanta spełniają wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami (Dz. U. 1789 z 27 września 2017 roku) oraz rozporządzenia MNiSz (w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora z dnia 19 stycznia 2018 r. (Dz. U. poz. 261 z dnia 30 stycznia 2018 roku), w sprawie kryteriów oceny osiągnięć osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego z dnia 1 września 2011 (Dz. U. 196, poz. 1165)), a także zwyczajowe stawiane kandydatom do stopnia dr. hab. Dlatego też pozytywnie opiniuję wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie Panu dr. Henrykowi Myszce stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk chemicznych w dyscyplinie chemia.

Krzysztof Ralhe