

Pracę pani Malarz obejmowała przesiewowe badania biologiczne nowych pochodnych tiosemikarbazonów, badania mechanizmu działania dla wybranych związków oraz możliwości ich zastosowania w terapii łączonej z fotouczulaczami. Przedmiotem badań pracy doktorskiej była biblioteka pochodnych tiosemikarbazonu, obejmująca 110 związków, należących do kilku serii zróżnicowanych strukturalnie grup związków. Struktury tych związków zawierały ugrupowanie semikarbazonu połączone z jednej strony z różnymi fragmentami aromatycznymi lub heteroaromatycznymi jak uktaad chinoliny, 8-hydroksychinoliny, chinoksaliny, różnie podstawionych pochodnych pirydyny oraz fenylu. Z drugiej strony, cząsteczki miały podstawniki aminowe, alkioloaminowe wbudowane w fragment amin cyklicznych, jak różnie podstawione arylopiperazyny, pochodne piperdyny czy inne. Związki te zostały zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Śląskiego a praca jest kontynuacją wcześniejszych badań prowadzonych w zespole profesora dr hab. Jarostawa Polańskiego oraz dr hab. Roberta Musioła.

Praca pod uwagę ich wpływ na komórki zdrowe jak nowo tworzące się, w niekontrolowany sposób. W ocenie nowych potencjalnych leków przeciwnowotworowych należy zatem od początku zacząć duży toksykologiczny lek dla zdrowych komórek, stąd wiele działań niepożądanych. politerapie celem uzyskania lepszego efektu terapeutycznego. Problemem chemioterapii jest przeciwnowotworowe mogą mieć różne punkty uchwytu działania, często stosuje się nowotworów, wybór takiego celu badań jest w pełni uzasadniony. Lekki to choroby nowotworowe. Ze względu na brak skutecznych terapii dla wielu typów *przeciwnowotworowych*" to fragment takich badań. Cel terapeutyczny w pracy pani Malarz czassterek. Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "*Chelatory metali w terapiach* synteza chemiczna i następnie badania biologiczne oceniające aktywność nowo otrzymanych drogi jest wybór celu terapeutycznego, celów molekularnych, projektowanie struktur, lekami, to druga, wieloletnia droga, wymagająca badań interdyscyplinarnych. Na początku tej Poszukiwanie związków bioaktywnych, które w przyszłości mogłyby stać się nowymi

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Malarz pt. "*Chelatory metali w terapiach przeciwnowotworowych*" wykonanej w ramach studiów doktoranckich Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach w Zakładzie Chemii Organicznej, pod kierunkiem dr hab. Roberta Musioła oraz dr Anny Mrozek-Wilczkiewicz.

Recenzja

Kraków 8-01-2018

UNIWERSYTET PAŃSZYCH DOBROTY  
KATEDRA CHEMII FARMACEUTYCZNEJ  
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leków  
30-688 Kraków, ul. Medyczna 9  
tel. (0-12) 659-12-76, 657-05-60  
fax. (0-12) 657-02-62

Wnioski z tego fragmentu badań rozszerzają wiedzę o molekularnych mechanizmach działania przeciwnowotworowego tiOSEMIKARBAZONÓW. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez doktorantkę zróżnicowanych testów biochemicznych w tych badaniach oraz umiejętność wykorzystania dostępnej w Śląskim Międzuczelnianym Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych Uniwersytetu Śląskiego aparatury, jak mikroskop fluorescencyjny i konfokalny, mikrokapilarny cytometr przepływowy, zestawy do

Druąa część pracy obejmowała dla 9 wyselekcjonowanych związków poszerzone badania *in vitro*, mające na celu wyjaśnienie ich molekularnego mechanizmu działania. Wybór testów do tych badań, opierał się na znanych wcześniejszych danych o molekularnym mechanizmie działania pochodnych tiOSEMIKARBAZONÓW, jak zdolności chelatującej czy wpływ na zmianę potencjału redoks w komórkach. Doktorantka wykonała testy oceniające wpływ jonów metali (żelaza i miedzi) na cytotoxyczność badanych tiOSEMIKARBAZONÓW, ich wpływ na generowanie reaktywnych form tlenu, na poziom wewnątrzkomórkowego glutationu w zależności od czasu. Ponadto zbadano wpływ tiOSEMIKARBAZONÓW na regulację cyklu komórkowego, indukując apoptozę oraz zdolność do oddziaływania z DNA. Na podstawie uzyskanych wyników przedstawiono zróżnicowane mechanizmy działania pochodnych tiOSEMIKARBAZONÓW z jonami żelaza i miedzi. Te pierwsze wyniki są prawdopodobnie z ich zdolności chelatowania oraz wrażliwości komórek na zmiany stężenia żelaza czy reaktywnych form tlenu. Badania z zastosowaniem jonów miedzi potwierdziły wiążące siły jonoforcenne pochodnych tiOSEMIKARBAZONÓW. Wykazano, że tiOSEMIKARBAZONÓW wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, co było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dla tej klasy związków. Jako główny mechanizm działania tiOSEMIKARBAZONÓW uznano udział w reakcjach przemian żelaza (reakcje Fentona i Haber Weissa) oraz wpływ na zakłócenie obrony systemu antyoksydacyjnego komórki. Ponadto, potwierdzono zdolność związków do oddziaływania z DNA poprzez proces interkalacji, co może inicjować uszkodzenie kwasów nukleinowych.

Badania przesiewowe polegały na sprawdzeniu w warunkach *in vitro* aktywności antyproliferacyjnej dla wszystkich 110 związków, wobec dwóch linii komórek nowotworowych raka jelita grubego (HCT116p53<sup>-/-</sup> i HCT116p53<sup>+/+</sup>). Dla aktywnych w tych testach 41 związków wykonano dodatkowo badania wobec komórek dwóch linii glejaków (U-251, H5683) oraz raka piersi (MCF-7), ponadto ocenę cytotoxyczności wobec komórek prawidłowych fibroblastów (NHDF). Badania te wykonano według standardowych procedur a wyniki zostały zebrane w 15 tabelach, uwzględniających różne struktury badanych tiOSEMIKARBAZONÓW. Jako związki referencyjne w niektórych tabelach umieszczono dane dla badanych wcześniejszych pochodnych o zbliżonej strukturze. Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników przedstawiła bardzo szczegółową analizę zależności strukturalno-aktywnej. Wszystkie wybrane do badań pochodne tiOSEMIKARBAZONÓW wykazały silniejszą aktywność antyproliferacyjną *in vitro* na dwóch liniach komórkowych HCT116p53 oraz MCF-7, w porównaniu do leku referencyjnego tj. dokсорubicyny. Takie wartościowe wyniki należy uznać za istotne osiągnięcie zespołu chemiczno-biologicznego. Ponadto wyniki te pozwoliły na wytyczenie dalszych kierunków modyfikacji chemicznej struktur i prac syntetycznych.

prowadzenia reakcji PCR oraz inne. Niewątpliwym autorem pani mgr Katarzyna Malarz jest jej bardzo dobre podstawowe wykształcenie na kierunku biotechnologii Uniwersytetu Śląskiego.

Ostatni etap badań doświadczałnych obejmował analizę możliwości zastosowania pochodnych tioseminkarbazonu jako adjuwantów w terapii fotodynamicznej. Na podstawie wyników badań dla 3 związków, potwierdzono synergistyczne działanie pochodnych tioseminkarbazonu oraz fotoczułaczy a także zróżnicowany sposób generowania reaktywnych form tlenu. Te wyniki mogą mieć aspekt praktyczny w przypadku rozwoju badań w tej grupie pochodnych.

Cała praca napisana jest przejrzysto i opracowana bardzo starannie. Część teoretyczna, wprowadza czytelnika w zagadnienia rozwijane w badaniach własnych autorki, które także zredagowane są dobrze i ciekawie. Nie mniej jednak mam kilka uwag i pytań do doktorantki, które przedstawiam poniżej.

Praca napisana jest według schematu, w którym jego pierwszą częścią jest rozdział „Założenia i cel pracy”. Główny cel pracy oraz cele szczegółowe zostały przedstawione prawidłowo. Być może w pierwszym zdaniu lepiej byłoby określić jeszcze klasę związków chemicznych w jakiej będą prowadzone badania. Drugi akapit tego krótkiego rozdziału przedstawiony jest w formie stanowiącej raczej podsumowanie „Efektów tych prac jest ...”. Co zatem uznać za sformułowane w tytule „Założenia pracy”? Osobście jestem zwolennikiem układu pracy doktorskiej zbliżonej do schematu publikacji tj. wprowadzenie, uzasadnienie/złożenia i cel badań, opis badań własnych z dyskusją, podsumowanie.

Uwagę redakcyjną miałabym natomiast do numeracji związków. Pozostawienie oryginalnych symboli roboczych w pracy nie ułatwia jej czytania, chociaż dla autorki są wygodne i mogą zapewnić jej uniknięcie błędów przy przenieśnięciu związków. Ponadto dyskusyjny jest sposób umieszczania związków w tabelach, gdyż wynika on z zachowania kolejności numeracji symboli związków a nie ze struktury podstawników. Do szerokiej i ciekawej dyskusji zależności struktura-aktywność miałabym też uwagę, dlaczego nie odniesiono się do porównania aktywności tioseminkarbazonów do leków referencyjnych np. dokсорubicyny.

Inna uwaga dotyczy tabel, w których zostały umieszczone jako „związki referencyjne” otrzymane i zbadane wcześniej niektóre pochodne tioseminkarbazonów. Czym kierowano się w wyborze tych związków, czy była to najbardziej aktywna zsynchronizowana wcześniej pochodna? Dla analizy zależności struktura-aktywność w niektórych tabelach można by umieścić także związki stanowiące dobry punkt odniesienia (o ile były otrzymane), jak np. w tabelach 1, 2, 5, 8 i 10 pochodne z ugrupowaniem 4-fenylolipiperazynowym.

Dla „związków referencyjnych” jak je określono, badania powinny być powtórzone. Z opisu pracy wynika, że takich badań dla „związków referencyjnych” nie powtórzone.

Brak informacji czy komentarza w pracy na temat różnych stężeń pochodnych tioseminkarbazonu (1  $\mu\text{M}$ ) oraz doksorubicyny (5  $\mu\text{M}$ ) stosowanych w testach biochemicznych. Przy porównaniu aktywności związków powinni być stosowane takie samo stężenie. Czy badano doksorubicynę w niższym stężeniu tj. 1  $\mu\text{M}$  ?

Doktorantka cytuje 371 pozycji literaturowych, co moim zdaniem jest zbyt dużą liczbą. Cała praca napisana jest bowiem na 166 stronach z czego 35 to cytowane piśmiennictwo. Część teoretyczna pracy porusza różne zagadnienia, jednak przy takim opracowaniu istotna także jest umiętność wyboru tylko najważniejszych pozycji piśmiennictwa. Inna uwaga redakcyjna dotycząca tej części pracy to pozycje [285] i [296] – w spisie literatury powinna znaleźć się informacja, iż są to prace doktorskie i miejsce ich obrony.

Inna uwaga redakcyjna, która nasunęła mi się podczas czytania pracy, to brak informacji, czy najaktywniejsze związki, lub też seria aktywnych pochodnych tioseminkarbazonów są przedmiotem zgłoszenia patentowego.

Podsumowując, przedstawione powyżej uwagi i pytania nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy doktorskiej, wyników badań i sposobu ich prezentacji i dyskusji. Mogą one natomiast stanowić zachętę do wykorzystania ich przy przygotowywaniu pracy do publikacji.

Wartością naukową wykonanych prac mgr katarzyny Malarz jest bogata charakterystyka właściwości przeciwnowotworowych oraz badania mechanizmu działania dużej biblioteki pochodnych tioseminkarbazonów.

Przedstawiona do oceny praca odpowiada w pełni wymogom stawianym pracom naukowym na stopień doktora, dlatego stawiam wniosek Radzie Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie pani mgr katarzyny Malarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr. hab. Barbara Malawska

Prof. dr. hab. Barbara Malawska  
Katedra Fizykochemicznej Analizy Leku  
Katedry Chemii Farmaceutycznej  
Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku

Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku  
Katedry Chemii Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum