

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Deptuły p.t. „Wpływ podstawników polieterowych na aktywność biologiczną analogów kurkuminy” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Beaty Gruber i prof. dr. hab. Adama Krówczyńskiego

Jako cel swojej pracy Doktorant przyjął otrzymanie analogów kurkuminy rozpuszczalnych w wodzie kierując się oczekiwaniem, że analogi te wykażą aktywność cytotoksyczną, będą nietoksyczne dla zdrowych komórek, a także będą łatwo przyswajalne a w dodatku wolniej metabolizowane. Wybór tematu rozprawy dobrze wpasowuje się w szeroki nurt poszukiwań związków o własnościach przeciwnowotworowych.

W części literaturowej Doktorant dość szczegółowo omówił wyniki współczesnych badań wpływu kurkuminy i jej analogów na liczne nowotworowe linie komórkowe z uwypukleniem indukowania procesów komórko-specyficznej apoptozy. W omówieniu tym Doktorant wykazał się szeroką wiedzą o sposobach badania lokalizacji kurkuminy w komórkach oraz o mechanizmach jej działania z uwzględnieniem procesów zachodzących na poziomie molekularnym. Doktorant szeroko zaprezentował wzajemne powiązania szeregu procesów biochemicznych na poziomie komórek, opisał działanie kurkuminy w kontekście cyklu komórkowego, przedstawił jej wpływ na czynniki transkrypcyjne i na ekspresję genów oraz oddziaływania z wieloma białkami. Spory fragment części literaturowej obejmuje omówienie chemoprewencyjnego działania kurkuminy. Omówienie aktywności biologicznej kurkuminy zostało oparte na analizie literatury, która stanowi około 2/3 wszystkich zacytowanych w rozprawie pozycji. Tu uwaga pierwsza: pewien niedosyt sprawia fakt, że Doktorant zamieścił w omówieniu stosunkowo niewiele wyników otrzymanych w ostatnich latach, czyli po roku 2010.

Drugą istotną część przeglądu literaturowego Doktorant poświęcił omówieniu metod syntezy analogów kurkuminy z uwzględnieniem modyfikacji jej łańcucha łącznikowego oraz modyfikacji pierścieni aromatycznych. Doktorant załączył również krótki rozdział omawiający kompleksy kurkuminy z jonami metali. Przy okazji prezentowania kolejnych analogów i kompleksów Doktorant skomentował opartą na danych literaturowych ich aktywność biologiczną.

Ostatnią część wstępu literaturowego stanowi bardzo skąpy rozdział omawiający podstawowe i ogólnie znane własności ciekłych kryształów. Tu uwaga druga: Doktorant nie dołożył starań, aby tę część wstępu powiązać wyraźniej z celem rozprawy.

W drugiej części pracy, stanowiącej opis prac własnych, Doktorant przedstawił syntezę siedmiu symetrycznie podstawionych polieterowych analogów kurkuminy. Do ich otrzymywania zastosował metodę znaną uprzednio i opublikowaną. Analogi te zgodnie z oczekiwaniem bardzo dobrze rozpuszczały się w wodzie, co spowodowało nawet potrzebę modyfikacji metody ich izolowania. Analogi otrzymano z niezłą wydajnością oraz zidentyfikowano za pomocą analizy elementarnej i spektroskopii NMR. Badanie aktywności biologicznej Doktorant przeprowadził z użyciem ludzkich komórek białaczki promielocytarnej oraz ludzkich prawidłowych limfocytów B. Aktywność oznaczał wyznaczając wartość  $IC_{50}$  za pomocą barwnego testu EZ4U. Otrzymane wartości  $IC_{50}$  zostały w ocenie przydatności analogów odniesione do wartości tego parametru otrzymanego dla samej kurkuminy. Doktorant w ocenie posłużył się też drugim parametrem, którym dla każdego analogu był stosunek jego wartości  $IC_{50}$  zmierzonego dla komórek białaczkowych i

prawidłowych. Wyniki testów zaprezentowane w Tabeli 2 wskazują, że własności otrzymanych analogów nie odbiegają w sposób zasadniczy od własności samej kurkuminy. Tylko jeden analog (oznaczony jako 3) wykazywał większą od kurkuminy aktywność wobec komórek białaczkowych, chociaż wykazał też większą od kurkuminy aktywność wobec komórek prawidłowych. W tej sytuacji tylko ten analog został przez Doktoranta przebadany pod kątem porównania jego własności apoptotycznych z własnościami kurkuminy. Oznaki apoptozy w hodowlach komórek białaczkowych i prawidłowych Doktorant badał metodą mikroskopową z użyciem barwnika fluorescencyjnego i stwierdził jej obecność tylko dla komórek prawidłowych w przypadku obu związków, tzn. kurkuminy i analogu 3. Wynik ten został potwierdzony w badaniach lizatów z tych komórek, w których Doktorant za pomocą testu Western-Blot oceniał zawartość trzech białek apoptotycznych.

Doktorant przedstawił także syntezę 20 alkoksylowych analogów kurkuminy modyfikując zarówno jej pierścień łącznikowy, czyli pochodne pirazolu i izoksazolu, oraz modyfikując pierścień aromatyczny przez różne podstawniki alkoksylowe. Tożsamość związków potwierdził za pomocą analizy elementarnej oraz spektroskopii NMR. Posługując się mikroskopem polaryzacyjnym stwierdził, że cztery spośród otrzymanych analogów wykazują własności ciekłych kryształów. Dwa z nich okazały się być w wysokich temperaturach smektykami, a dwa inne występowały w temperaturach zbliżonych do pokojowej w fazie kolumnowej heksagonalnej. Za pomocą skaningowego kalorymetry różnicowego Doktorant wyznaczył temperatury przejść fazowych, które zebrał w Tabeli 3.

W dyskusji otrzymanych wyników Doktorat zanalizował krytycznie wprowadzone do kurkuminy modyfikacje polieterowe. Pomimo braku zadawalającej aktywności otrzymanych analogów oraz braku ich wybiórczości wobec komórek białaczkowych Doktorant wyciągnął wnioski odnośnie potencjalnych przyszłych modyfikacji strukturalnych kurkuminy. Tu uwaga trzecia: Wydaje się jednak, że różnice we własnościach cytotoksycznych prezentowanych analogów są zbyt mało znaczące, aby opierające się na nich wnioski przedstawione przez Doktoranta miały mocne podstawy. Niezależnie od tego przedstawiona rozprawa zawiera pierwsze badania wpływu hydrofilowości podstawników pierścieni aromatycznych kurkuminy na aktywność tego związku.

Uwaga czwarta: Dyskusja przeprowadzona przez Doktoranta dla wyników otrzymanych dla alkoksylowych pochodnych kurkuminy zawierających pierścień pirazolu bądź izoksazolu sprowadza się do suchego stwierdzenia faktu, że nie udało się otrzymać analogu rozpuszczalnego w wodzie a zarazem posiadającego własności ciekłego kryształu.

W trakcie czytania tej pracy oprócz czterech wymienionych wyżej uwag większej wagi nasunęły mi się następujące drobniejsze uwagi krytyczne:

- 1) własności fizykochemiczne kurkuminy opisane są w części literaturowej fragmentarycznie i rozrzucone są w kilku miejscach (na stronach 6, 8 i 16) częściowo powtarzając się. Natomiast brakuje istotnych dla tej pracy informacji, takich jak konkretnej wartości rozpuszczalności tego związku w wodzie (czyli 6,5 µg/mL), wartości pKa, procentowej zawartości formy enolowej (lub odpowiednich parametrów termodynamicznych różnych form).
- 2) w nawiązaniu do poprzedniej uwagi na stronie 17 czytamy: „Kurkumina wykazuje bowiem niestabilność w formie rozpuszczonej, jest nierozpuszczalna w wodzie”. Pytanie: to jest rozpuszczalna, czy jest nierozpuszczalna?
- 3) brakuje choćby jakościowego oszacowania rozpuszczalności otrzymanych analogów polieterowych.
- 4) brakuje systematycznego omówienia produktów rozpadu kurkuminy *in vitro* oraz jej metabolitów *in vivo*. Fragmentaryczne informacje dotyczące metabolitów są rozrzucone w różnych miejscach części literaturowej.

- 5) Praca jest napisana stosunkowo niestarannie, podaję tylko kilka przykładów:
- brakuje wzoru kurkuminy przy omawianiu jej budowy i własności w rozdziale „Cel pracy” natomiast niepotrzebnie wzór jest powtarzany w pracy na stronach 16, 19.
  - powinno być precyzyjnie stwierdzone, że stabilizacja cząsteczki kurkuminy jest zapewniona przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe (strona 5).
  - informacja o metodzie syntezy zastosowanej w pracy podana została w środku części literaturowej na stronie 18, zamiast w części „Materiały i metody”. Główny autor metody syntezy zastosowanej w tej części pracy występuje w tekście pod dwoma nazwiskami jako Pabon lub jako Pavon.
  - na stronie 8 czytamy, że: „Kurkumina w buforze wykazuje maksimum fluorescencji...” Pytanie w jakim buforze?
  - na stronie 27 czytamy: „tlen połączony z pierścieniem aromatycznym” - w odniesieniu do grupy fenolowej nie wydaje się być to określeniem ścisłym.
  - różna jest numeracja tych samych związków alkoksylowych w Tabeli 3 i na Rysunku 24.
  - niestaranny jest opis Rysunku 4.
  - skład tekstu i rysunków pozostawia sporo do życzenia przy współczesnych możliwościach edytorskich. Nie wspominając o literówkach.

#### Podsumowanie:

W pracy otrzymano dwie grupy pochodnych kurkuminy. Grupę analogów polieterowych zanalizowano pod kątem ich aktywności biologicznej stwierdzając brak związku pomiędzy ich rozpuszczalnością a aktywnością. Grupę analogów alkoksylowych zanalizowano pod kątem ich własności ciekłokrystalicznych. Zastosowanie w tych badaniach różnorodnych metod eksperymentalnych świadczy o opanowaniu przez Doktoranta warsztatu badawczego. Pozytywnie oceniam też uczestnictwo Doktoranta w złożonym działaniu, w którym połączono projektowanie związków, ich syntezę, badania spektroskopowe i badania biologiczne. Takie kompleksowe podejście daje w perspektywie szansę na zrozumienie związku pomiędzy strukturą i aktywnością.

Wyniki zawarte w przedstawionej rozprawie zostały już w części opublikowane w jednym artykule w czasopiśmie z listy filadelfijskiej oraz w jednym artykule w czasopiśmie polskojęzycznym. Publikacja z wyników badań biologicznych analogów polieterowych kurkuminy według Doktoranta jest w przygotowaniu.

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim, dlatego wnioskuję o dopuszczenie pana mgr. Tomasza Deptułę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

