



**Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Wydział Farmacji**

**Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych**

ul. Medyczna 9, PL 30-688 Kraków

tel. (012) 620 55 81; fax. (012) 620 55 96

**prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz**

(e-mail: *mfkonono@cyf-kr.edu.pl*)

## OCENA

rozprawy doktorskiej pt. „Synteza, analiza spektroskopowa i aktywność biologiczna nowych pochodnych 3-formylochromonu i związków kompleksowych z jonami Cu(II)”, wykonanej

przez

p. mgr. **Andrzeja Łazarenkowa** w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Katedry Chemii

Medycznej, Wydziału Farmaceutycznego

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Celem podjęcia badań, w ramach pracy doktorskiej, przez p. mgra Andrzeja Łazarenkowa była analiza danych literaturowych na temat chemii – syntezy i właściwości fizykochemicznych – oraz zastosowań biologicznych pochodnych 3-formylochromonów, a także kontynuowanie badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Bionieorganicznej Katedry Chemii Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem prof. dra hab. Justyna Ochockiego oraz Promotora niniejszej pracy – p. dr hab. Jolanty Nawrot-Modranki. Wartościowy przegląd literaturowy dokonany przez p. Łazarenkowa dotyczył nie tylko prostych pochodnych 3-formylochromonów, ale i ich analogów chemicznych z grupy pochodnych kumaryny lub flawonu oraz układów skondensowanych zawierających w swojej budowie układ podstawowy – układ chromonu. Szczególną uwagę zwrócił Doktorant na związki kompleksowe zawierające układ benzopironu z jonami metali. Podstawowym wnioskiem wynikającym z tego przeglądu było to, że pochodne 3-formylochromonów to grupa połączeń wykazująca ciekawe i ważne właściwości biologiczne, m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe, hamujące rozwój HIV, antyproliferacyjne, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, przeciwalergiczne, jak i działanie korzystne w zwalczaniu otyłości.

Mgr Łazarenkow wymienił leki stosowane w terapii (np. warfarynę o działaniu przeciwzakrzepowym, kwas kromoglikanowy o działaniu przeciwalergicznym), oraz zwrócił uwagę na związki wykazujące ciekawą aktywność biologiczną, zarówno związki pochodzenia

syntetycznego, jak i wyizolowane ze źródeł naturalnych (np. pochodne flawonu – apigeninę, luteolinę, genisteinę i azaizoflawon).

Część przeglądu literaturowego dotyczy połączeń uprzednio otrzymanych w jednostce macierzystej, tj. pochodnych fosforohydrazynowych i ich kompleksów, np. z Pd(II), wykazujących aktywność przeciwbakteryjną lub przeciwnowotworową.

Podsumowując część przeglądową pracy, podkreślić należy interesujące dane zgromadzone przez Doktoranta, które w pełni uzasadniają podjęcie badań w Jego pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zauważyć, że analiza tekstu nasyca pewne trudności, ponieważ Autor nie zastosował numeracji poszczególnych rysunków, ich podpisów oraz, co najważniejsze, nie zastosował jednolitej, ciągłej numeracji przedstawianych połączeń. W efekcie, miejscami stosuje się numerację tylko dla danej strony (np. str. 12, 13), niezbyt uzasadniony sposób numeracji (np. str. 23, 24, 25, 38) lub brak numeracji (w wielu rysunkach, np. str. 19, 21, 32, 34). W następstwie tego powstaje chaos w numeracji połączeń, pojawiają się trudności z jednoznacznym odczytaniem tekstu oraz opisu poszczególnych struktur. W niektórych rysunkach wkradły się błędy merytoryczne i techniczne (np., str. 26, 31, 45). Niektóre sformułowania i wyrażenia są niezręczne (np. badania bronchodilatoryjne). Ostatnia uwaga wymaga krótkiego komentarza – język polski nie jest językiem ojczystym Autora. Trudny język polski został jednak przez p. Łazarenkova opanowany w stopniu budzącym podziw.

Pan mgr Andrzej Łazarek przedstawia ambitną pracę doktorską, której realizacja wymagała wielu umiejętności. Wykonane zadania można podzielić na dwie grupy: synteza zaprojektowanych połączeń oraz badanie ich aktywności biologicznej. Autor przeprowadził syntezę wielu hydrazonów pochodnych 3-formylochromonów oraz dwóch ich kompleksów z jonami Cu(II), potwierdził czystość i strukturę otrzymanych połączeń wynikami analizy spektralnej ( $^1\text{H}$  NMR, IR, ESI-MS) i elementarnej. Szczególnie trudnym zadaniem było ustalenie struktury dwóch otrzymanych kompleksów (bez badań krystalograficznych), jedynie na podstawie analizy spektralnej (IR, MS) i elementarnej oraz analizy danych literaturowych. Autor uzupełnił opis otrzymywanych połączeń analizą ich właściwości fizykochemicznych wyznaczonych metodami eksperymentalnymi (trwałość w roztworach wodnych, wyznaczenie wartości  $\text{pK}_a$  metodą spektrofotometryczną) oraz metodami obliczeniowymi ( $\text{pK}_a$  i  $\log P$  w środowisku o różnym pH). Analiza właściwości fizykochemicznych jest szczególnie ważna dla związków, które mają być badane pod względem ich aktywności biologicznej. Jednak wniosek wyciągnięty przez Autora (str. 79) „... Otrzymane wartości  $\log P$  świadczą o możliwości przenikania otrzymanych związków przez bariery biologiczne...” oraz umieszczona dalej na tej

samej stronie dyskusja zależności budowa - właściwości analizowanych połączeń budzą pewne wątpliwości.

Drugą część rozprawy doktorskiej p. mgra Andrzeja Łazarenkowa to badania biologiczne. Autor wykonał badania aktywności przeciwbakteryjnej otrzymanych hydrazonowych pochodnych 3-formylochromonów wobec wybranych szczepów bakteryjnych. Stwierdził, że badane połączenia są w większości pozbawione aktywności przeciwbakteryjnej.

Celem dalszych badań było określenie aktywności cytotoksycznej otrzymanych przez Autora połączeń oraz trzech wcześniej otrzymanych w Zakładzie Chemii Bionieorganiczej fosforohydrazonowych pochodnych benzopironów. W tych badaniach zostały zastosowane linie komórkowe białaczek promielocytowej (HL-60) i limfoblastycznej (NALM-6). Na jednym z etapów przeprowadzanych testów Autor stosował także linię oporną (HL-60 ADR) z nadekspresją białka MRP1 wykonując porównania i stwierdzając równą aktywność badanych połączeń wobec obydwu typów linii komórkowych. Celem dalszych badań było określenie zdolności do indukcji apoptozy linii komórkowej HL-60 w teście oznaczania zawartości cytochromu c w cytozolu komórkowym. W badaniach prowadzonych nad liniami komórkowymi czerniaka (VM-115) oraz raka piersi MCF-7 Autor określił wpływ badanych połączeń na proliferację wymienionych komórek. Przeprowadził badanie wpływu wybranych pochodnych na zawartość zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) w lizatach komórek VM-115. Celem tego badania było potwierdzenie możliwości zastosowania oznaczenia zawartości bFGF oraz jego receptora FGFR1 do dalszych badań i oszacowanie potencjalnego wpływu badanych związków na angiogenezę. W badaniach nad proliferacją linii komórkowej MCF-7 Autor stwierdził wyraźny dwójaki wpływ badanych połączeń na proliferację tych komórek, zależny od stosowanego ich stężenia. W odpowiednio dobranych stężeniach była możliwa stymulacja proliferacji tych komórek lub zahamowanie ich wzrostu. Podczas analizy przedstawionych wyników powstaje pytanie, jakimi przesłankami kierował się Autor przy doborze wybranych dla wymienionych linii komórkowych testów oraz połączeń (odniesienie do poprzednio prowadzonych badań czy danych literaturowych). Wyniki prowadzonych badań zostały zilustrowane wieloma rycinami, które obrazują interpretację otrzymanych wyników. Ta część pracy oraz interpretacja otrzymanych wyników wymagała ogromnego wkładu pracy Doktoranta.

Pewne niedociągnięcia, które można dostrzec w tej części pracy dotyczą raczej zagadnień formalnych. Autor nie podał pochodzenia stosowanych linii komórkowych. Wprawdzie dołączona do pracy doktorskiej publikacja (Med. Chem. Res. 2012, 21, 1861-1868), w której p. mgr Andrzej Łazarenkow jest pierwszym autorem, częściowo uzupełnia ten brak, jednak jeśli w rozprawie zostały umieszczone inne szczegóły metodyczne, to dane takie powinny być także

podane. Ponadto, czy rzeczywiście na str. 135 Autor zgodnie z tytułem rozdziału 7.4 dyskutuje proliferację komórkową linii VM-115? Pragnę podsumować ten fragment recenzji stwierdzeniem, że celem tych uwag jest jedynie pomoc w redagowaniu przez Autora przyszłych publikacji otrzymanych wyników. Uwagi te nie umniejszają merytorycznej wartości recenzowanej pracy.

Rozprawa doktorska p. Łazarenkowa (obszerna, licząca 160 stron, zawierająca 154 cytowań) ma układ konsekwentny i bardzo logiczny. Doktorant wykazał w niej umiejętność przeprowadzenia zaprojektowanych syntez, łącznie z otrzymywaniem związków kompleksowych, analizą właściwości fizykochemicznych badanych struktur, zarówno metodami obliczeń komputerowych, jak i metodami analizy danych eksperymentalnych, umiejętność badania aktywności biologicznej: przeciwbakteryjnej i cytotoksyczności otrzymanych połączeń, badania wpływu na proliferację komórkową z zastosowaniem testu MTT, poziom białek bFGF i FGFR1, analizy otrzymanych wyników badań, zarówno chemicznych, jak i opracowania statystycznego wyników badań biologicznych. Wykazał się zdolnością formułowania dobrze przemyślanych wniosków. Pod względem graficznym praca jest przygotowana bardzo starannie: bardzo dobrze i estetycznie zilustrowana, z dużą dbałością o dopracowanie niezbędnych szczegółów.

Stwierdzam, że recenzowana praca odpowiada w pełni wymaganiom stawianym pracom doktorskim i przedkładam wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie p. mgra Andrzeja Łazarenkowa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę sposób wykonania pracy doktorskiej, włożony wysiłek oraz zdobyte przez Doktoranta różnorodne umiejętności **wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy.**

KIEROWNIK  
Katedry Technologii i Biotechnologii  
Środków Leczniczych  
  
prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz

Kraków, 15 października 2014 r.