

Prof. dr. hab. n. med. Zenon Czuba  
Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach  
ul. H, Jordana 19,  
41-808 Zabrze  
Tel.: 32 272 25 54, e-mail: zczuba@sum.edu.pl

Zabrze, 15.04.2020r.

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej wykonanej przez mgr Annę Empel pod tytułem:**

**„Synteza nowych diazafenotiazynowych pochodnych pirydyny i ich właściwości  
cytotoksyczne”**

**Promotor: Dr hab. n. farm. Andrzej Zięba, prof. SUM**

Pochodne fenotiazyny stanowią liczną, syntetyczną grupę związków tricyklicznych z których około 150 zostało wykorzystanych w lecznictwie. Pierwszej syntezy pierścienia fenotiazynowego dokonał Bernthsen w 1883 roku. Kolejnym, znanym w medycynie związkiem z tej grupy jest błękit metylenowy zsyntezowany przez Caro. Szybki rozwój w uzyskiwaniu nowych pochodnych fenotiazyn nastąpił po syntezie w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku chlorpromazyny, stosowanej jako lek o działaniu neuroleptycznym. Pochodne fenotiazyn wykazują oprócz aktywności przeciwpsychotycznej szereg interesujących właściwości biologicznych wśród których jest między innymi działanie przeciwbakteryjne, przeciwpierwotniakowe, przeciwwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwprionowe, neuroprotektoryjne, przeciwhistaminowe oraz przeciwnowotworowe. To ostatnie działanie jest szczególnie interesujące w dobie zagrożenia chorobami nowotworowymi, które są często związane ze starzeniem się społeczeństwa oraz oddziaływaniem wielu niekorzystnych czynników środowiska w którym znajduje się organizm. Nasza ograniczona wiedza z zakresu powstawania komórek nowotworowych, ich rozwoju, udziału mechanizmów układu odpornościowego w rozwoju nowotworów oraz skąpe możliwości terapii, szczególnie w zaawansowanej chorobie nowotworowej, sprzyja podejmowaniu badań w tym zakresie. Stąd próba syntezy nowych pochodnych fenotiazyn o potencjalnym działaniu na komórki

nowotworowe wydaje się jak najbardziej zasadna i wpisuje się bardzo pozytywnie w prace prowadzone od wielu lat w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Empel liczy 137 stron i jest przygotowana zgodnie z zaleceniami dla tego typu prac. Praca zawiera bardzo szczegółowy spis treści, spis skrótów i symboli, wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, 11 wniosków, streszczenia w wersji polskiej i angielskiej, wykaz rycin i tabel oraz piśmiennictwo w liczbie 207 pozycji ułożonych w kolejności cytowania. Pracę kończy załącznik obejmujący dorobek naukowy Doktorantki.

W wykazie skrótów w pozycji LUMO powinno być „najniższy nieobsadzony orbital molekularny (ang. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)”. Podobny błąd wkradł się w tekście na stronie 45.

W bardzo obszernym wstępie (str.12-39) Doktorantka szczegółowo wprowadza czytelnika w budowę i właściwości fenotiazyn z uwzględnieniem ich struktury przestrzennej, a następnie opisuje metody syntezy układu fenotiazynowego. Na stronie 17 prawdopodobnie zamiast  $BaF_3$  powinien być  $BF_3$ . W kolejnym rozdziale możemy zapoznać się z aktywnością neuroleptyczną fenotiazyn w odniesieniu do ich struktury chemicznej oraz z ich zastosowaniem. W dalszej części wstępu można znaleźć obszerne omówienie mechanizmów działania leków przeciwnowotworowych z uwzględnieniem antybiotyków antracyklinowych. Na stronie 28 występuje niezgodność opisu w tekście z ryciną 9. Jest: „Pierścień B ma strukturę chinonu, natomiast pierścień C-hydrochinonu.”. Prawdopodobnie powinno być odwrotnie. Kolejne strony są poświęcone obecnej w piśmiennictwie wiedzy na temat mechanizmów aktywności przeciwnowotworowej fenotiazyn. Przedstawiona wiedza jest aktualna, uwzględniająca najnowsze piśmiennictwo i przedstawiona w sposób przejrzysty. Na stronie 30 w zdaniu „Już w latach 80 ubiegłego De Mol...” powinno być prawdopodobnie „ubiegłego wieku”, a na stronie 38 w przedstawionym ugrupowaniu acylowym wkradło się błędnie potrójne wiązanie CO.

Na stronie 40 Autorka uzasadnia zakres podjętych badań oraz określa szczegółowe cele, które dotyczą optymalnej metody syntezy piridochinotiazyn z uwzględnieniem ich modyfikacji strukturalnych, potwierdzenie struktury otrzymanych związków metodami spektroskopowymi oraz analizą strukturalną X-ray. Bardzo ważnym celem założonym przez Doktorantkę była ocena aktywności biologicznej uzyskanych związków oraz próba korelacji tej aktywności z deskryptorami fizykochemicznymi. W kolejnym rozdziale znajdujemy szczegółowy opis

metod badawczych stosowanych do analizy otrzymanych związków oraz ich oceny biologicznej. W metodzie wyznaczania aktywności cytotoksycznej (strona 46) zastosowano test WST-1. Ocenę działania cytotoksycznego określa się przez pomiar absorbancji w świetle przechodzącym przy długości fali 450nm, a nie metodą fluorescencji jak zaznaczyła Autorka.

W kolejnym obszernym rozdziale „Wyniki” znajdujemy bardzo szczegółowe opisy syntezy pochodnych fenotiazyn. Oprócz metod syntezy zostały umieszczone tabele przedstawiające parametry poszczególnych reakcji łącznie z temperaturą i czasem reakcji oraz wydajnością i temperaturą topnienia. Przedstawiono również wyniki obliczeń teoretycznych dotyczące struktury otrzymanych związków oraz szczegółowe dane uzyskane z zastosowanych technik do potwierdzenia struktury otrzymanych związków oraz mechanizmów reakcji. Zastosowano współczesne metody spektroskopii masowej, rezonansu protonowego i węgla  $^{13}\text{C}$  oraz stosowne techniki obliczeniowe. Zastosowane nowatorskie metody syntezy oraz dalsza analiza otrzymanych związków wymagała bardzo dużego doświadczenia laboratoryjnego, wiedzy oraz cierpliwości Doktorantki. Niektóre syntezy prowadzono przez 30 dni. Bardzo duże znaczenie w ocenie możliwości interkalacji otrzymanych związków do DNA mają dane dotyczące struktury krystalicznej, które zostały wykonane za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej.

U honorowaniem długiej pracy laboratoryjnej są uzyskane wyniki badań biologicznych przeprowadzone na czterech referencyjnych liniach komórkowych przeprowadzone w warunkach *in vitro*. Wiele uzyskanych pochodnych pirydochinotiazyniowych oraz chinoliniowych wykazuje wysoką aktywność cytotoksyczną w odniesieniu do zastosowanych komórek. Ponadto wiele pochodnych chlorków chinoliniowych wykazało aktywność przeciwbakteryjną w odniesieniu do 12 referencyjnych szczepów drobnoustrojów

W dyskusji Doktorantka wykazała się dobrą znajomością współczesnego piśmiennictwa z zakresu swojej pracy, znajomością zastosowanych metod analizy struktur oraz wnikliwym podejściem do analizowanych reakcji chemicznych.

Doceniam również podjętą próbę oceny badanych związków z wykorzystaniem metod chemii kwantowej. Niestety nie udało się uzyskać korelacji struktura – aktywność biologiczna.

Dobrym podsumowaniem dyskusji są wnioski w liczbie 11.

Przedstawione w rozprawie piśmiennictwo zostało właściwie dobrane i umieszczone w kolejności użycia w tekście. W pozycji 24 piśmiennictwa, której jestem współautorem Doktorantka nie umieściła inicjału mojego pierwszego imienia.

W tekście pracy, obce, odmieniane nazwiska kończące się spółgłoską powinny być w większości przypadków pisane bez apostrofu.

W podsumowaniu pragnę zaznaczyć, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest oryginalnym opracowaniem o wysokiej wartości merytorycznej z możliwością potencjalnego wykorzystania uzyskanych pochodnych fenotiazyn w przyszłych projektowanych terapiach, a opracowane nowe metody syntezy oraz poznane mechanizmy reakcji mogą być pomocne w otrzymaniu nowych bardziej aktywnych związków.

W mojej ocenie recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 1789), dlatego z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Anny Empel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na szeroki zakres wykonanych badań, opracowanie nowych rozwiązań w zakresie syntezy oraz uzyskanie nowych aktywnych biologicznie pochodnych fenotiazyn o potencjalnym zastosowaniu w terapii, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem

