

Gdańsk 10.08.2015

Dr hab. inż. Marek Konieczny  
Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Gen. J. Hallera 107  
80-416 Gdańsk

**RECENZJA**  
**rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Psurskiego**  
**„Nowe formułacje naturalnych izotiocyanianów o potencjalnej aktywności**  
**przeciwnowotworowej”**

### 1. Wstęp

Rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Psurskiego poświęcona jest badaniom nad zastosowaniem izotiocyanianów i kwasów merkapturowych w terapii przeciwnowotworowej i składa się z dwóch metodycznie różnych części. Pierwsza obejmuje syntezę odpowiednich związków chemicznych a druga badania biologiczne otrzymanych preparatów. Prace obejmujące syntezę chemiczną i wszechstronne badania aktywności biologiczne nie należą do rzadkości, nieczęsto zdarza się natomiast, żeby oba typy badań były prowadzone przez tę samą osobę w dwóch różnych, wyspecjalizowanych laboratoriach, co w tym przypadku znajduje swoje odbicie również w tym, że praca ma dwoje promotorów. Ten dualizm metodyczny musiał stanowić duże wyzwanie dla Doktoranta, gdyż wymagał od niego opanowania wiedzy i techniki pracy z dwóch odrębnych dziedzin.

Niezgodny z przedstawioną pracą tytuł „Nowe formułacje naturalnych izotiocyanianów...” oraz rozważania przedstawione na stronach 38 – 39 sugerują, że pierwotna koncepcja pracy zawierała również, a może przede wszystkim, opracowanie formy leku nadającej się do podawania tytułowych związków. Szkoda, że w trakcie przewodu tytuł ten nie został zmieniony, gdyż obecnie tylko niepotrzebnie wprowadza zamieszanie.

### 2. Ocena tematyki pracy

Tematyka pracy nie jest nowa i od wielu lat wiadomo, że występujące w naturze izotiocyaniany mają korzystny wpływ na zdrowie człowieka, i na temat najpopularniejszych związków z tej grupy opublikowano po kilkadziesiąt, jeżeli nie kilkaset prac. Jednakże zastosowanie różnych technik badawczych oraz różnice w strukturach badanych związków powodują, że w oparciu o dostępne dane praktycznie niemożliwe jest stworzenie zwartego obrazu działania biologicznego izotiocyanianów a zwłaszcza jego zależności od budowy związków.

Przedstawiana praca jest próbą zebrania danych, które potencjalnie mogłyby ułatwić systematyczną analizę zależności struktura – aktywność. Pierwszym jej etapem była synteza 8 grup pochodnych izotiocyanianów i kwasów merkapturowych, o stopniowo, w logiczny sposób modyfikowanych wewnątrz każdej grupy strukturach. W sumie otrzymano około 100 związków docelowych. W drugim etapie przeprowadzono obszerne badania *in vitro* i *in vivo* własności biologicznych otrzymanych preparatów.

Uważam, że wszechstronne i systematyczne podejście do tematu stanowi najcenniejszy element przedstawianej rozprawy i decyduje o jej wartości. Tak zdefiniowany program badań zdecydowanie wart był podjęcia a uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w naszą wiedzę o tej grupie związków i co ważne ułatwiają jej analizę, i usystematyzowanie.

Na marginesie uwag o celowości podjęcia tej tematyki, chciałbym zwrócić uwagę na skrótowo przedstawione na str. 39 rozważania nad celowością prób wprowadzenia do terapii związków, o których wiadomo, że działają na wiele celów molekularnych. Podejmując badania tioizocyjanianów jako potencjalnych leków, Doktorant złamał dwie ogólnie przyjęte zasady współczesnej chemii medycznej. Pierwsza z nich mówi, że dobre leki oddziałują tylko z jednym celem molekularnym a druga, że grupa tioizocyjanianowa należy do grup niepożądanych, ze względu na jej zbyt dużą, nieselektywną reaktywność (np. *Nat. Drug Disc. Rev.* **2013**, *12*, 948, Box 2). Pełna dyskusja tego zagadnienia przekracza zakres tej recenzji, uznają jednak decyzję o podjęciu takiej tematyki badawczej za poprawną, gdyż uważam, że obie wymienione wyżej zasady mają swe źródło głównie we współcześnie przyjętej strategii poszukiwania leków i ich stosowanie nie zawsze jest uzasadnione.

### 3. Ocena wyników pracy doktorskiej

#### 3.1. Synteza chemiczna

Tak jak podkreślono w pracy, celem przedstawionych badań nie było opracowanie nowych metod chemicznych lecz otrzymanie związków docelowych, i podejście takie uważam za prawidłowe. Opis otrzymywania każdej z grup pochodnych poprzedza krótka analiza dostępnych metod syntezy i uzasadnienie wyboru określonego sposobu postępowania. W części eksperymentalnej dla każdego związku podano widma NMR oraz MS, co biorąc pod uwagę, stosunkowo prostą strukturę tych pochodnych wystarcza, aby w sposób przekonywujący potwierdzić ich budowę. Przytłaczająca większość, jeżeli nie wszystkie z opisanych pochodnych są już opisane w literaturze, niestety w pracy brak odpowiednich odnośników. Jest to niezgodne z dobrą praktyką chemiczną, która nakazuje podawanie literatury oryginalnej do każdego opisywanego związku. Niedopatrzenie to uważam za największą wadę części chemicznej rozprawy.

Nie mam wątpliwości, że otrzymanie związków końcowych oraz niezbędnych substratów wymagało od Doktoranta dobrego opanowania metod syntezy, izolacji oraz określania struktury związków organicznych.

Mam pytanie dotyczące syntezy kwasów merkapturowych wywodzących się z alkilo- i aryloalkiloizotiocyanianów (**N1** – **N26**), chciałbym spytać, jaka była czystość tych związków? Reakcje prowadzono w alkoholowo-wodnym roztworze kwaśnego węgla sodu stosując 10 % nadmiar izotiocyanianu w stosunku do acetylocysteiny. Po reakcji nadmiar izotiocyanianu usuwano przez ekstrakcję heksanem, mieszaninę zakwaszono i ekstrahowano octanem etylu. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymywano oczekiwany produkt. Czy tak izolowane produkty nie zawierały np. nieprzereagowanej acetylocysteiny czy też wywodzących się z niej produktów ubocznych, zwłaszcza w przypadkach, gdy wydajność reakcji była niższa, np 65 % (dla **N5**) czy 47 % (dla **N15**), co sugeruje niepełne przereagowanie substratów lub powstawanie produktów ubocznych?

Na zakończenie komentarzy dotyczących części chemicznej mam uwagę dotyczącą nomenklatury. Mianowicie, Autor konsekwentnie używa nazw izotiocyanianów, w których nazwa rodnika alkilowego kończy się na „-ylowy”, np. izotiocyanian allilowy, benzyloowy itd. Zgodnie z zasadami prezentowanymi w „Nomenklaturze związków organicznych” (Rekomendacje IUPAC i nazwy preferowane 2013, pod redakcją O. Achmatowicza, S. Achmatowicza, R. Bodalskiego i B. Szechner) zalecaną formą jest „izotiocyanian alkilu”, tak jak to pokazano w punkcie P-15.2.1.1: Przykłady:  $\text{CH}_3\text{-CO-Cl}$  chlorek acetylu;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CO-CN}$  cyjanek benzoilu;  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-NCS}$  izotiocyanian benzylo.

### 3.2. Badanie aktywności antyproliferacyjnej

Tytułowe badania przeprowadzono stosując metodę SRB, a uzyskane wyniki w klarowny sposób przedstawiono w szeregu tabel. Każdej z nich towarzyszy krótka dyskusja zależności struktura – aktywność, ułatwiająca śledzenie wyników pracy. Moje wątpliwości budzi jedynie celowość dyskusji wpływu rozgałęzienia łańcucha alkilowego na aktywność cytotostaticzną (str. 50, dół strony) i próba skorelowania tych dwóch czynników z reaktywnością grupy izotiocyanianowej. Szukanie takiej korelacji wydaje się być nieuzasadnione, gdyż np. tak zawada przestrzenna jak i efekt indukcyjny dla związków **20** i **23** powinny być podobne a tymczasem ich aktywność biologiczna jest różna, przynajmniej dla linii LoVo.

### 3.3. Badania mechanizmu działania

Dla 17 zróżnicowanych strukturalnie związków przeprowadzono badania mające na celu zbadanie ich akumulacji w komórkach, aktywność, pro-apoptyczną, wpływ na cykl komórkowy i szereg innych efektów. Znaczący fragment pracy poświęcono zbadaniu możliwości przekształcania kwasów merkapturowych w izotiocyaniany w warunkach stresu oksydacyjnego. Celem tych badań było sprawdzenie czy kwasy merkapturowe mogą potencjalnie pełnić rolę proleków aktywowanych do izotiocyanianów w tkankach o podwyższonym poziomie reaktywnych form tlenu, a więc w warunkach występujących w guzach nowotworowych.

### 3.4. Badania aktywności przeciwnowotworowej *in vivo*

Do badań wybrano 10 pochodnych (5 izotiocyanianów i 5 wywodzących się z nich kwasów merkapturowych). Przeprowadzono badania toksyczności i wykazano, że w stosowanych dawkach nie występują efekty wskazujące na toksyczność. Następnie przeprowadzono badania aktywności przeciwnowotworowej z wykorzystaniem mysiego nowotworu gruczołu sutkowego 4T1 oraz ludzkiego nowotworu jelita grubego opornego na doksorubicynę LoVoDX. Ostatni fragment pracy poświęcono badaniom *in vitro* i *in vivo* możliwości wykorzystania izotiocyanianów w terapii skojarzonej z doksorubicyną.

### 3.5. Dyskusja

Opis wyników własnych zamyka obszerna dyskusja, podsumowująca uzyskane wyniki i porównująca je z danymi literaturowymi. W konkluzji jeszcze raz zwrócono uwagę na możliwość wykorzystania kwasów merkapturowych jako proleków izotiocyanianów. Sugestia ta jest w pełni uzasadniona i uzyskane wyniki potwierdzają celowość prowadzenia dalszych prac w tym kierunku.

## 4. Drobne usterki

W pracy występuje wiele drobnych błędów, są one wymienione poniżej.

Spis treści, ostatnia pozycja: „doborek” zamiast „dorobek”

W „Spisie stosowanych skrótów”, część terminów jest tłumaczona z angielskiego na polski a część nie, to jest pewien brak konsekwencji.

str. 15, wiersz 12: gramatyka, zamiast „które” użyć np. „co”

str.16, schemat 1: w pracach chemicznych wprowadza się na ogół rozróżnienie terminu „schemat”, który jest zarezerwowany dla schematów reakcji i terminu „rysunek”, którym opisywane są wszelkie inne przedstawienia graficzne, np. wzory chemiczne. W tej pracy wszystkie obrazy są nazywane schematami.

str. 18, wiersz przedostatni: „iHerb.com” – to miał być odnośnik literaturowy?

str. 22, wiersz 15: powinno być „przegrupowanie” a nie „rearanżacja” Lossena

str. 22, schemat 4: jest „myrozynaza” zamiast „mirozynaza”

str. 38, wiersz 4: powinno być „spośród” a nie „z pośród”

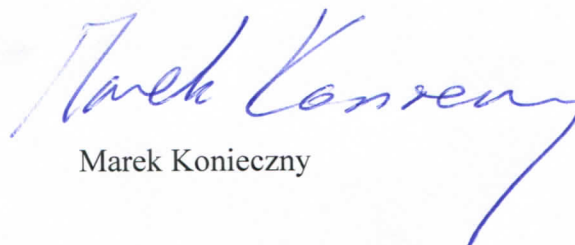
str. 43, ostatni wiersz: cytowane 183 jest błędne

str 44, wiersz 8: jest „izotiocyjaniany benzyłowy”, powinno być „izotiocyjanian benzyłu”  
str.44, ostatnie 2 wiersze: brak numerów związków  
str 45, wiersz 11 od końca: jest „chloromrówczan” powinno być „chloromrówczanu”  
str 47, schemat 10 i tabela 1 (str. 49) tytuł: powinno być „... uzyskanych aralkiloizotiocyjanianów i alkiloizotiocyjanianów”  
str. 48, wiersz 13: powinno być IC<sub>50</sub> a nie IC50, podobnie w tabeli 1 na str. 49 i w innych miejscach  
str 51, schemat 11 i tabela 2 (str. 52), tytuł: powinno być „... pochodnych aralkiloizotiocyjanianów i alkiloizotiocyjanianów”  
str. 52, wiersz 1: jest „... spadek aktywności ...” powinno być „... **wzrost lub** spadek ... (oznaczono **odpowiednio** ...”  
str. 53, wiersz 3 od dołu: jest „przetawiono” powinno być „przedstawiono”  
str. 54, schemat 12: jest „reflux” powinno być „wrzenie”, podobnie schemat 14 (str. 58).  
str 57, wiersz 3 od dołu: jest „oksydację” powinno być „utlenianie, podobnie na str. 58, wiersz 3  
str. 59, wiersz 3: Tabela 5 prezentująca związki siarki obecne w roślinach krzyżowych nie istnieje  
str. 67, wiersz 8: jest „metylosulfinylowym (67)”, powinno być „metylosulfonylowym (67)”  
str. 85, wiersz 8 od dołu: jest „nie możliwe” powinno być „niemożliwe”  
str. 76 – 79, tabele 9 -12: Oznaczenia faz cyklu komórkowego podaje się z indeksem dolnym, np G<sub>1</sub> a nie G1.  
str. 98, wiersz 9 i str. 99, wiersz 8: jest „bis-N-acetylocystyna”, powinno być „N,N'-diacetylocystyna”  
str. 98, wiersz 9: jest „widm spektroskopowych”, powinno być „widm absorpcyjnych UV-VIS”  
str. 98, wiersz 11: jest „ekstremum absorpcji” powinno być „maksimum absorpcji”  
str. 99, wiersz 3: jest „intermediatu” powinno być „związku przejściowego”  
str. 100, schemat 24: wzór disiarczków **97/98** powinien być ujęty w nawias kwadratowy, gdyż zgodnie z opisem na str. 99, nie udało się wykazać ich obecności w mieszaninach reakcyjnych.  
str. 124, wiersz 13: jest „... przedstawiono na wykres 25.” powinno być „... przedstawiono na wykresie 25.”  
str. 153, wiersz 16: jest „beznopirenu” powinno być „benzopirenu”  
str. 173,189: używanie angielskiego skrótu eq uważam za niewłaściwe, istnieje polski termin „równoważnik”  
str. 213, spis treści: niekonsekwentne stosowanie nazw czasopism, czasami są one podawane w pełnej formie, czasami w skróconej.  
str. 235, Pozycja literaturowa Eur. J. Cancer 2012, 48, S249: to jest komunikat zjazdowy a nie publikacja, pracę tę wymieniono też w komunikatach konferencyjnych na str. 236  
str. 235, Pozycja literaturowa Eur. J. Cancer 2013, 49, S170: to jest komunikat zjazdowy a nie publikacja, pracę tę wymieniono też w komunikatach konferencyjnych na str. 236, co więcej, spis treści Eur. J. Cancer nie pokazuje tej pracy.

## 5. Podsumowanie

Mimo przedstawionych uwag polemicznych i krytycznych uważam, że Doktorant zrealizował postawione przed sobą cele, i że przedstawiona rozprawa stanowi wartościowy wkład w naszą wiedzę. Należy tylko żałować, że więcej uwagi nie poświęcił edycyjnej stronie przedstawianej rozprawy, gdyż liczne drobne usterki psują dobre wrażenie.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorant wykazał się inwencją naukową, dociekliwością i pracowitością. Uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki ustawy i wnoszę o dopuszczenie mgr Mateusza Psurskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Marek Konieczny