

prof. dr hab. Monika Wujec
Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, 10.01.2021

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej pt. „Synteza, badania spektroskopowe i strukturalne oraz ocena właściwości przeciwnowotworowych nowych pochodnych kolchicyny” wykonanej w Zakładzie Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Na raka umiera ponad 8 milionów osób rocznie. W Polsce rak zabija blisko 110 tysięcy osób, z czego około 100 tysięcy umiera w wyniku nowotworów złośliwych. Nowotwory złośliwe stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów, powodując około 25% zgonu u mężczyzn i 21,5% u kobiet. Kobiety najczęściej chorują na raka piersi, raka płuc, raka szyjki macicy oraz raka jelita grubego. Mężczyźni natomiast chorują przede wszystkim na raka płuc. Stanowi on ponad 20% wszystkich zachorowań na nowotwory u mężczyzn. Dane te zmieniają się w zastraszającym tempie. Wciąż rośnie liczba zachorowań. Z jednej strony jest to spowodowane złą profilaktyką a z drugiej brakiem skutecznych terapii.

Do najważniejszych metod walki z nowotworami można zaliczyć wciąż klasyczną chirurgię onkologiczną, chemioterapię, hormonoterapię, radioterapię a także metody nowoczesne, innowacyjne jak immunoterapia, terapia genowa czy też leczenie celowane molekularnie. Pomimo bardzo szybkiego rozwoju nowych metod leczenia wciąż jeszcze klasyczna chemioterapia jest podstawą leczenia wielu rodzajów nowotworów. Stosowane leki często obciążone są wieloma działaniami niepożądanymi. Stąd wiele laboratoriów na świecie poszukuje analogów znanych leków, o lepszej biodostępności a jednocześnie niższej toksyczności wobec komórek prawidłowych. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy.

Celami pracy było

- opracowanie wydajnych metod syntezy pochodnych kolchicyny, zmodyfikowanych w pozycji C(4), C(7) oraz C(10)
- ustalenie struktury otrzymanych pochodnych w oparciu o metody spektralne

- określenie aktywności przeciwnowotworowej nowych związków w badaniach *in vitro*
- modelowanie oddziaływań nowych pochodnych kolchicyny wobec kolchicynowego miejsca wiążącego z użyciem modelowania molekularnego
- określenia zależności pomiędzy strukturą a aktywnością zsyntetyzowanych związków.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera wprowadzenie i cel pracy, część literaturową, badania własne, podsumowanie, część eksperymentalną, piśmiennictwo oraz katalog widm. Praca liczy 291 stron. Duża ilość przejrzystych schematów i rysunków pomaga czytelnikowi w interpretacji ogromu otrzymanych wyników badań. Wprowadzenie i cele realizowanej pracy badawczej opisane są w sposób zwięzły i klarowny.

W części literaturowej Autorka opisuje bardzo szeroko budowę kolchicyny, rolę poszczególnych jej fragmentów w modulowaniu aktywności biologicznej, zastosowanie farmakologiczne kolchicyny oraz jej udokumentowaną aktywność przeciwnowotworową. Jest to wyczerpujące opracowanie, świadczące o dużej wiedzy Doktorantki z zakresu zarówno chemii, jak i farmakologii. Przegląd literatury jest oparty na 158 pozycjach literaturowych.

Analizując rozdział poświęcony badaniom własnym daje się zauważyć ogromną pracowitość i skrupulatność Doktorantki. Opisuje, w sposób niezwykle szczegółowy, wszystkie etapy syntezy, łącznie z mechanizmami tworzenia nowych związków.

Jako pierwsze mgr Urszula Majcher-Uchańska otrzymała *N*-fenyloloczynnikowe pochodne kolchicyny w pozycji C(7) (związek 4) i C(10) (związek 6). Związek 4 otrzymano w reakcji *N*-deacetylokolchicyny z izocyjanianem fenylu. Reakcja ta wymagała przekształcenia kolchicyny w reakcjach opisanych przez Bagnato w *N*-deacetylokolchicynę. Związek 6 otrzymała w reakcji dwuetapowej z C(10)-demetoksy-C(10)aminokolchicyny i izocyjanianem fenylu. Kolejnym etapem pracy syntetycznej było otrzymanie uretanowych pochodnych tiokolchicyny. Synteza obejmowała trzy etapy: otrzymanie tiokolchicyny, deacetylacja tiokolchicyny, reakcja z trifosgenem oraz pierwszo- i drugorzędowymi alkoholami. W ten sposób Doktorantka otrzymała 11 pochodnych tiokolchicyny z dobrymi wydajnościami rzędu 35-90%. Kolejne pochodne to związki 20-24, będące uretanowymi pochodnymi kolchicyny otrzymanymi w reakcji *N*-deacetylokolchicyny z metanolem, etanolem, propanolem, 2,2,2-trifluoroetanolem oraz 3,6-dioksooktanodiolem. Powodzenie reakcji modyfikacji w pozycji C(7) skłoniło Doktorantkę do podjęcia próby otrzymania *N*-uretanowych pochodnych kolchicyny w pozycji C(10). Niestety, pomimo zastosowania dwóch procedur syntetycznych, nie udało się otrzymać żądanych produktów. Otrzymano natomiast związek z dodatkowym

pierścieniem 1,3-oksazolo-2(5*H*)-onu. Ponadto, Urszula Majcher-Uchańska opracowała nową metodę syntezy 10-demetoksy-10-chlorokolchicyny z 10-demetoksykolchicyny. Analizując prace innych autorów, w szczególności dotyczące zmiany aktywności biologicznej na skutek wprowadzenia fluorowca w pozycję 4 kolchicyny, postanowiono otrzymać pochodne zmodyfikowane w pozycji 4 (atomem fluorowca) oraz jednocześnie w pozycji 10 (zamiana grupy metoksylowej na tiometylową) celem sprawdzenia w jakim stopniu te przekształcenia wpłyną na aktywność biologiczną. Synteza 4-halogeno-analogów kolchicyny została wcześniej opisana, jednak zachodziła z bardzo niskimi wydajnościami. Wobec tego Doktorantka opracowała wydajne metody syntezy 4-bromo-, 4-jodo- oraz 4-chlorokolchicyny. Modyfikacje metody polegały na zmianie reagentów oraz warunków reakcji. Otrzymane w ten sposób halogenopochodne kolchicyny poddano reakcji z metanotioianem sodu otrzymując odpowiednie 4-podstawione pochodne tiokolchicyny. Uzyskane wyniki modyfikacji stały się inspiracją do otrzymania pochodnych *N*-uretanowych i *N*-aminowych 4-podstawionych pochodnych tiokolchicyny. W tym miejscu nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka otrzymała aminowe i uretanowe pochodne 4-bromokolchicyny oraz 4-jodokolchicyny? Brak danych na temat pochodnych z atomem chloru w pozycji 4, chociaż taką pochodną również otrzymała.

Wszystkie otrzymane związki zostały scharakteryzowane bardzo rzetelnie. Dla wszystkich wykonano pełną analizę spektralną (¹H NMR, ¹³C NMR, FT-IR, ESI-MS, EI-MS). Ich struktura nie budzi zastrzeżeń. Dla dwóch związków, we współpracy z prof. Janem Janczakiem z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu, wykonano również analizę rentgenostrukturalną.

Podsumowując część syntetyczną pracy pragnę stwierdzić, iż Doktorantka wykonała ogromną ilość doświadczeń, często żmudnych, wymagających nie tylko precyzji ale także uwagi, spostrzegawczości i pomysłowości a także oczywiście wiedzy. W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymała 65 pochodnych kolchicyny, z czego 24 to związki nieopisane w literaturze przedmiotu natomiast struktura 25 związków, została opublikowana przez Doktorantkę i wsp. Kolejnym etapem pracy badawczej było zbadanie aktywności przeciwnowotworowej nowootrzymanyh pochodnych kolchicyny. Badania przeprowadzono w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu we współpracy z zespołem prof. Joanny Wietrzyk. Do oceny aktywności przeciwnowotworowej sześciu spośród badanych związków (*N*-fenyłomocznikowych pochodnych i produktów pośrednich) użyto linii: ostrej białaczki promielocytowej (HL-60), jej sublinię oporną na winkrystynę (HL-60/vinc), gruczolakoraka jelita grubego, wrażliwą na doksorubicynę (LoVo) oraz oporną (LoVo/DX).

Pozostałe zsyntetyzowane pochodne badano stosując linie komórek nowotworów ludzkich: gruczolakoraka płuc (A549), gruczolakoraka sutka (MCF-7) oraz linię gruczolakoraka jelita grubego, wrażliwą (LoVo) i oporną (LoVo/DX) na doksorubicynę. Ponadto, celem stwierdzenia selektywności działania nowosyntetyzowanych związków w badaniach wykorzystano prawidłową myszą linię komórkową embrionalnych fibroblastów (BALB/3T3). W opisie badań brakuje stwierdzenia skąd taki wybór? Dlaczego pochodne fenylocetynowe badano na innych liniach niż pozostałe?

Wyniki badań biologicznych wskazują na znaczącą aktywność kilkunastu z nowych pochodnych. W pierwszej grupie związków, najbardziej obiecującą strukturą jest pochodna fenylocetynowa o bardzo wysokim wskaźniku selektywności (powyżej 44), natomiast najwyższą aktywnością charakteryzowała się *N*-Boc-deacetylokolicyna. W przypadku serii uretanowych pochodnych tiokolchicyny, większość testowanych związków charakteryzowała się wyższą aktywnością niż kolchicyna i leki referencyjne: doksorubicyna i cisplatyna. Najaktywniejsze wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych okazały się pochodne otrzymane w reakcji z metanolem, butanolem oraz 2,2,2-trifluoroetanolem.

Pochodne uretanowe kolchicyny charakteryzowały się dobrą aktywnością, jednak niższą niż analogi tiokolchicyny, podobnie jak seria pochodnych zawierających atom halogenu w pozycji C(4). Wyniki badań biologicznych serii uretanowych pochodnych 4-bromo- oraz 4-jodotiokolchicyny wykazały, że cytotoksyczność prawie wszystkich pochodnych jest wyższa niż leków referencyjnych oraz charakteryzują się one znaczną selektywnością. Aminowe pochodne 4-halogenopodstawionej kolchicyny charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością przeciwnowotworową, porównywalną z aktywnością kolchicyny, niższą jednak niż odpowiednio 4-bromokolchicyna oraz 4-jodokolchicyna.

Wyniki badań biologicznych zostały poparte badaniami *in silico*. We współpracy z prof. Jackiem Tuszyńskim przeprowadzono dokowanie molekularne otrzymanych pochodnych kolchicyny, zbadano ich interakcje z β I-tubuliną w pobliżu miejsca wiązania kolchicyny (ang. *colchicine binding site, CBS*) oraz obliczono energie wiązania związków z docelowym miejscem wiążącym w tubulinie. W większości przypadków stwierdzono dość dobrą korelację pomiędzy wartościami IC_{50} uzyskanymi w badaniach *in vitro* a wynikami *in silico* wyrażonymi jako energia wiązania i współczynnik podziału, co dobrze rokuje na przyszłość. Planując kolejne syntezy można najpierw przeprowadzić symulacje, co obniży koszty i zaoszczędzi wiele czasu.

We współpracy z dr Alicją Urbaniak oraz prof. Timothy C. Chambersem z Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Nauk Medycznych w Arkansas wykonano

rozszerzone badania biologiczne dla wybranych uretanowych pochodnych tiokolchicyny i związków pośrednich.

Dla wybranych pochodnych wykonano analizę cytometryczną cyklu komórkowego oraz zbadano wpływ na organizację mikrotubul za pomocą metod fluorescencyjnych. Badania miały na celu określenie prawdopodobnego mechanizmu działania pochodnych kolchicyny. Uzyskane wyniki okazały się niejednoznaczne, stąd konieczność prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

Dodatkowo oceniono aktywność wybranych związków w stosunku do komórek pierwotnej białaczki limfoblastycznej (ALL) oraz nowotworu piersi (w badaniach *in vitro* i *ex vivo*). Są to niezwykle ważne badania, będące uzupełnieniem doświadczeń na liniach komórkowych. Uzupełnieniem badań w kierunku aktywności przeciwnowotworowej było sprawdzenie wpływu kolchicyny oraz pochodnej uretanowej tiokolchicyny na aktywność winkrystyny, znanego leku destabilizującego mikrotubule. Uzyskane wyniki świadczą o antagonistycznym działaniu kolchicyny w stosunku do winkrystyny, w przeciwieństwie do pochodnej uretanowej tiokolchicyny otrzymanej w reakcji 7-deacetylo-10-tiokolchicyny z etanolem, która to w stężeniu 0,250 nM działa synergistycznie.

Na koniec testów biologicznych przeprowadzono eksperyment, który obejmował badania przesiewowe 7 związków (w tym kolchicyny) przeciwko panelowi linii ludzkich komórek nowotworowych NCI-60. Trzy spośród nich wykazały aktywność wyższą niż kolchicyna w stosunku do większości typów nowotworów.

Ostatni rozdział badań własnych traktuje o zależności pomiędzy strukturą i aktywnością biologiczną syntetyzowanych pochodnych. Jest on doskonałym narzędziem dla osób zajmujących się projektowaniem nowych pochodnych kolchicyny. Pozwoli na racjonalne projektowanie nowych związków.

Reasumując uważam, że wykonane, w ramach przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej bardzo obszerne badania zaowocowały wieloma interesującymi, oryginalnymi wynikami, które zostały właściwie przeanalizowane i przedstawione i w sposób przejrzysty i atrakcyjny graficznie.

Praca mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej jest przykładem doskonale zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Sadzę, że promotor, prof. Adam Huczyński miał w tym niewątpliwie ogromny udział.

Praca doktorska mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej napisana jest poprawną polszczyzną. Przy tak obszernym opracowaniu znalazłam niewiele błędów o charakterze redakcyjnym. Znajdują się na stronach: 7, 10, 12, 13, 14, 18, 21, 23, 28, 29, 31, 33, 47, 62, 82, 84, 11, 157, 166, 175.

W ramach ćwiczeń wzrokowych , w wolnym czasie proszę je znaleźć. Na schematach (str. 51, 62,66) są błędne wzory związków.

Mam jedną uwagę, w moim odczuciu dobrze byłoby umieścić w części eksperymentalnej obok wzorów i opisu właściwości związków, również ich nazwy. Nie podano również temperatur topnienia, co jest również zwyczajowo podawaną wielkością charakterystyczną dla danego związku. Ponadto, stwierdzenie "Bazując na wielu ciekawych wynikach naukowych (...)" (str. 45) bez podania literatury nie powinno, w moim odczuciu, znaleźć się w pracy naukowej. Te drobne uwagi w żaden sposób nie wpływają na moją wysoką ocenę przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam ją za niezwykle ciekawą oraz nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Należy jeszcze dodać, iż Doktorantka jest współautorem 7 publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania IF ponad 30. Jest to imponujący dorobek jak na aplikanta do stopnia doktora. Z uwagi na aktualność prowadzonych badań, ich zakres, wartość praktyczną uzyskanych wyników a także znaczny dorobek publikacyjny wnioskuję o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Mam zaszczyt przedstawić Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM w Poznaniu wnioski o nadanie mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej stopnia doktora nauk chemicznych.

