



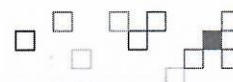
Lublin, 25.01.2021

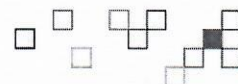
RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Urszuli Majcher-Uchańskiej, zatytułowanej "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 pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Huczyńskiego

W chwili obecnej choroby nowotworowe bez wątpienia stanowią jedno z najważniejszych wyzwań w walce o poprawę jakości życia i zdrowia ludzkiego, prowadzonej przez zastępy naukowców i lekarzy. Z uwagi na złożoność procesów związanych z niekontrolowanym rozrostem oraz wciąż słabym poznaniem mechanizmów działania tego typu tworów walka z nowotworami jest bardzo trudna, co widać w statystykach śmiertelności. Nie dziwi więc, że na opracowywanie nowych farmaceutyków, terapii i strategii leczenia przeznaczane są olbrzymie kwoty zarówno przez sektor publiczny jak i prywatny w Polsce i na świecie. W przypadku środków mających działanie regulujące aktywność nowotworów można z kolei wyróżnić dwa podejścia. Pierwsze z nich polega na projektowaniu struktury substancji aktywnej w oparciu o związki syntetyczne, drugim podejściem z kolei jest wykorzystanie związków pochodzenia naturalnego i ewentualnie ich modyfikacja w celu uzyskania pożądanego efektu. Jednym ze związków pochodzenia naturalnego o dużym potencjale terapeutycznym jest kolchicyna, którą można wyizolować z nasion ziemowita jesiennego. Znane jest jej działanie jako czynnika hamującego podział komórkowy poprzez uniemożliwienie wytworzenia wrzeciona kariokinetycznego, co wydaje się być idealnym celem terapeutycznym w walce z szybko namnażającymi się komórkami nowotworowymi. Niestety, wadą kolchicyny jest jej wysoka ogólna toksyczność, co w połączeniu z bardzo niską dawką śmiertelną powoduje, iż jej okno terapeutyczne jest bardzo wąskie. Mając jednak na uwadze wysoką aktywność tego związku oczywistym staje się podjęcie prób modyfikacji struktury kolchicyny w celu zarówno dalszego zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej jak również zmniejszenia toksyczności ogólnej. Zatem cel pracy doktorskiej obrany przez Doktorantkę, który polegał na opracowaniu syntezy nowych pochodnych kolchicyny i oceny ich przydatności jako substancji posiadających właściwości przeciwnowotworowe należy uznać za bardzo wartościowy pod względem naukowym i posiadający duży potencjał aplikacyjny.

Rozprawa doktorska przygotowana przez Doktorantkę posiada klasyczny układ z podziałem na trzy główne rozdziały: część literaturową, badania własne z podsumowaniem oraz część eksperymentalną. Pewną nowością dla mnie jest dodanie do pracy katalogu widm związków otrzymanych w ramach badań, co z drugiej strony pozwala na natychmiastowe skontrolowanie postulowanych struktur bez konieczności wnikliwego wczytywania się w część eksperymentalną. Część literaturowa podzielona jest na kilka rozdziałów, poświęconych omówieniu struktury i stereochemii kolchicyny, jej farmakokinetyce i metabolizmowi czy zastosowaniom farmakologicznym. Osobny podrozdział poświęcony został omówieniu właściwości przeciwnowotworowych kolchicyny, ze szczególnym uwzględnieniem sposobu wiązania się tego związku w komórkach oraz mechanizmu hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Co





najdziwniejsze, w części literaturowej brakuje opisu dotyczącego sposobów strukturalnej modyfikacji kolchicyny mających na celu otrzymanie jej analogów. Obawiam się, że ta tematyka mogła być w swoim czasie obiektem bardzo intensywnych badań z uwagi na rozpoznane właściwości kolchicyny, więc i ilość podjętych prób mających na celu otrzymanie jej analogów będzie duża. Omówienie danych literaturowych pod tym kątem pozwoliłoby na wyrobienie opinii na temat nowości metodologii syntetycznych wykorzystanych w pracy. Brak tego fragmentu jest tym bardziej zaskakujący, że część syntetyczna zajmuje jedną trzecią części badawczej w przygotowanej rozprawie. Chciałbym poznać uzasadnienie Doktorantki co do braku omówienia chemicznej modyfikacji kolchicyny w części literaturowej.

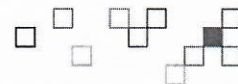
Część poświęcona omówieniu badań własnych została przez Doktorantkę podzielona na trzy części. W pierwszej części została omówiona synteza pochodnych kolchicyny o różnym stopniu zmodyfikowania szkieletu wyjściowej cząsteczki. Pierwsza faza była poświęcona wymianie podstawnika acetylowego na uretanowy na atomie azotu znajdującym się na węglu C7. W drugiej fazie modyfikacja wyjściowej kolchicyny miała miejsce na węglu C10, gdzie grupa metoksylova została początkowo wymieniona na aminową a następnie fragment uretanowy. Dwie pochodne udało się otrzymać w formie krystalicznej i ustalić ich strukturę za pomocą analizy rentgenostrukturalnej oraz porównać otrzymane wyniki z strukturami uzyskanymi przy pomocy metod obliczeniowych. W trzeciej fazie modyfikacja kolchicyny polegała na wymianie podstawników w dwóch miejscach: atomie węgla C7 i atomie węgla C10. Modyfikacja na atomie węgla C10 polegała na wymianie grupy metoksylowej na grupę tiometylową, natomiast modyfikacja na atomie węgla C7 polegała na hydrolizie *N*-acetamidowego fragmentu i uzyskaniu odpowiedniej aminy, którą poddano w następnym etapie reakcji z trifosgenem i alkoholem, co prowadziło do powstania serii karbaminianów zawierających różne funkcje estrowe. Analogiczną serię karbaminianów Doktorantka otrzymała z kolchicyny ale w tym przypadku modyfikacja miała miejsce tylko w jednym miejscu. Ciekawą była próba otrzymania pochodnych karbaminianowych na węglu C10. W tym przypadku wymiana grupy OMe na NH₂ zachodziła jednak następcza reakcja z trifosgenem i alkoholem prowadziła raczej do powstania produktu zawierającego dodatkowy pierścień 2(5H)-oksazolonu. Alternatywna próba z wprowadzeniem funkcji karbaminianowej na węglu C10 poprzez hydrolizę grupy OMe a następnie reakcja z fosgenem i aminą spowodowała utworzenie pochodnej zawierającej atom chloru na węglu C10, co wydaje się być nowym sposobem modyfikacji kolchicyny.

W kolejnej fazie Doktorantka podjęła próbę otrzymania podwójnie modyfikowanych pochodnych kolchicyny, gdzie jedną modyfikacją było wprowadzenie atomu halogenu na atom węgla C4 a drugą – wprowadzenie grupy SMe na atom węgla C10. Cel ten udało się osiągnąć, aczkolwiek według słów Doktorantki efektywność tych przekształceń była zależna od wprowadzanego podstawnika halogenowego.

W ostatniej fazie części syntetycznej Doktorantka podjęła próbę otrzymania pochodnych kolchicyny zmodyfikowanych w trzech pozycjach: C4, C7 i C10. W pozycji C4 został wprowadzony halogen, w pozycji C10 – grupa SMe i w pozycji C7 – fragment karbaminianowy. Dodatkowo, Doktorantka otrzymała serię pochodnych będących produktami podwójnej modyfikacji w pozycjach C4 i C10, odpowiednio przez halogen oraz grupę aminową.

Przeprowadzone przez Doktorantkę próby pozwoliły na otrzymanie sporej ilości pochodnych kolchicyny o różnym stopniu modyfikacji w kilku pozycjach. Trudno jest obiektywnie ocenić bez własnoręcznego wglębiania się w problem, w jakim zakresie zaproponowane przekształcenia reprezentują nowe podejście w syntezie pochodnych tego typu i na ile wykorzystane przez Doktorantkę metody otwierają nowe możliwości modyfikacji kolchicyny. Z nielicznych odniesień w tekście zakładam, że przynajmniej część metod przekształcania kolchicyny była odwzorowywana bądź modyfikowana na podstawie już znanych transformacji.

Analizując część syntetyczną badań własnych nasunęło mi się kilka dodatkowych pytań, na które chciałbym uzyskać odpowiedź od Doktorantki.

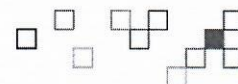


1. Dość nietypowo wygląda reakcja wymiany podstawników na atomie węgla C10. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić mechanizm tego typu przekształcenia?
2. W przypadku tworzenia pochodnych karbaminianowych Doktorantka postuluje tworzenie w pierwszym etapie karbaminianu zawierającego resztę trichlorometoksyłową (patrz Rysunek 24). Czy nie lepszym byłoby założenie, iż w pierwszym etapie tworzy się izocyjanian, zwłaszcza że sposób prowadzenia tej transformacji to sugeruje.
3. Tworzenie pochodnej **26** zawierającej dodatkowy pierścień 2(5H)-oksazolonu nie musi oznaczać porażki. Najprawdopodobniej reakcja tego związku z alkoksylanem pozwoli na otwarcie tego pierścienia i utworzenie docelowego produktu. Czy była podjęta tak próba?
4. Próba utworzenia karbaminianu ze związku **27** również nie przyniosła pożądanego produktu. Wydaje się, że można byłoby taki produkt otrzymać poprzez reakcję transestryfikacji wychodząc z **27** i jakiegoś karbaminianu. Czy taka próba była podjęta?
5. Czy były jakiegokolwiek przesłanki literaturowe do podjętej przez Doktorantkę decyzji o modyfikacji pierścienia aromatycznego poprzez wprowadzenie tam atomu halogenu?

Kolejny fragment badań własnych poświęcony był badaniom nad aktywnością przeciwnowotworową otrzymanych przez Doktorantkę związków. Do badań początkowo użyto zestawu szeregu ludzkich linii komórkowych nowotworów, zarówno wrażliwych na działanie leków jak i lekoopornych. Dodatkowo, do badań użyto cisplatynę oraz doksorubicynę jako związki referencyjne o ustalonej aktywności przeciwnowotworowej. Omówione w pracy wyniki pozwalają stwierdzić, że wiele spośród uzyskanych pochodnych miało większą zdolność do inhibicji proliferacji komórek nowotworowych aniżeli związki referencyjne. Dodatkowo, znaczna ich ilość wykazywała się lepszymi właściwościami przeciwnowotworowymi aniżeli wyjściowa kolchicina. Porównano także cytotoksyczność badanych związków w przypadku prawidłowych komórek fibroblastów, co dało możliwość zbadania poziomu selektywności badanych związków w kierunku redukcji aktywności komórek nowotworowych. Okazało się, że współczynniki selektywności dla badanych związków były różne, jednak dla wielu z nich można było zaobserwować wysoką selektywność w kierunku działania na komórki nowotworowe, co jest akurat pożądane w terapii gdyż środek działa przede wszystkim na tkanki zmienione chorobowo a nie na zdrowe. Z kolei aktywność otrzymanych w pracy pochodnych wobec lekoopornych szczepów nowotworów była zdecydowanie mniej obiecująca i chociaż w większości przypadków aktywność pochodnych była wyższa aniżeli związków referencyjnych, to już toksyczność wobec komórek prawidłowych była porównywalna do tej dla nowotworowych a częstokroć ją nawet przewyższała.

Dla serii pochodnych oraz dla samej kolchicyny przeprowadzono także pogłębione badania w kierunku hamowania aktywności proliferacyjnej nowotworów. Zbadano między innymi cykl komórkowy dla komórek nowotworu MCF-7, które wskazało na zatrzymanie podziału komórkowego na etapie G2/M. Dla kolchicyny i jednej jej pochodnej zbadano depolimeryzację mikrotubul przy pomocy mikroskopii immunofluorescencyjnej. Zestaw pochodnych został także wykorzystany do zbadania aktywności wobec pierwotnych linii komórek nowotworowych (ALL-5, IDCG3, MC), z których tylko kilka wykazało się efektywnością lepszą niż wyjściowa kolchicina. Dodatkowo problemem tutaj okazała się niska selektywność związków wobec komórek nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych. W końcowym etapie tych badań przeprowadzono badania panelowe dla 60 linii komórkowych różnych nowotworów dla szeregu pochodnych, które wykazywały największą aktywność we wstępnych badaniach. We wszystkich przypadkach zaobserwowano zmniejszenie wzrostu komórek nowotworowych a w niektórych przypadkach widoczny był nawet ich spadek ze względu na śmierć komórkową.

Analizując tę część narzuca się pytanie o udział Doktorantki w przeprowadzeniu tej części badań, która jest bardzo rozległa i zajmuje sporo miejsca przy opisie badań własnych. Na wstępie tego rozdziału jest dość enigmatycznie napisane o ich przeprowadzeniu w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej

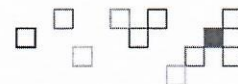


PAN we Wrocławiu. Chciałbym prosić o bardziej szczegółowe odniesienie się Doktorantki do tego zapisu. Odnosząc się bezpośrednio do materiału opisanego w tej części widoczne są pewne niekonsekwencje w prowadzeniu badań. Dlaczego dla związków 1-6 do badań został wybrany szczep HL-60 i jego lekooporna odmiana HL-60/vinc, podczas gdy w pozostałych zamiast nich były wykorzystane komórki linii A-549? Dlaczego do badań nad cyklem komórkowym został wybrany inny zestaw związków aniżeli do badania panelowego? Wydaje się raczej oczywiste, że jeżeli celem początkowych badań jest wyłapanie najbardziej rokujących związków, to powinny one być poddane bardziej szczegółowym badaniom i ewentualnie zakwalifikowane do dalszych prac. Poza tym brakuje mi dyskusji nad powiązaniem wyników badań nad aktywnością przeciwnowotworową z analizą dotyczącą dalszych modyfikacji kolchicyny, gdyż uzyskane wyniki, chociaż obiecujące, nadal wskazują na kilka nierozwiązanych problemów.

Część ostatnia badań własnych dotyczyła analizy oddziaływań pochodnych kolchicyny z kolchicynowym miejscem wiążącym w tubulinie, gdyż jakość tego wiązania jest postulowana jako istotny czynnik odpowiedzialny za aktywność związku. Podjęto tutaj próbę powiązania energii wiązania się dwóch fragmentów z aktywnością przeciwnowotworową. W zależności od typu nowotworu, korelacja pomiędzy tymi dwiema wartościami wykazywała zbieżność od bardzo dobrej do właściwie żadnej, co było tłumaczone różnymi dodatkowymi efektami występującymi w komórkach nowotworowych, jak zbyt szybkie usuwanie przy pomocy cząsteczek transportujących. Dodatkowo okazało się, że w zależności od budowy tubuliny efektywność jej wiązania się z pochodną kolchicyny może się różnić znacząco. Oznacza to, obserwowany efekt przeciwnowotworowy jest de facto wypadkową wynikającą ze zróżnicowanego sposobu wiązania się związku z poszczególnym izotypem tubuliny.

Analizując tę część narzuca się ponownie pytanie o udział Doktorantki w przeprowadzeniu tej części badań, która jest również rozległa i zajmuje sporo miejsca przy opisie badań własnych. Tutaj także jest dość enigmatyczny zapis dotyczący współpracy z prof. Jackiem Tuszyńskim. Chciałbym prosić o bardziej szczegółowe odniesienie się Doktorantki do tego zapisu. Analizując warstwę merytoryczną tej części przez cały czas zastanawiałem się nad powodem umieszczenia tego fragmentu w rozprawie. Jak słusznie zauważa Doktorantka w rozprawie, wprowadzenie nowych środków terapeutycznych wymaga obecnie ogromnych nakładów finansowych ze względu na konieczność otrzymania dużych bibliotek związków i określenie ich aktywności biologicznej. Jednym ze sposobów obniżenia kosztów może być wykorzystanie narzędzi stosowanych w chemii teoretycznej, za pomocą których można przeprowadzić optymalizację oddziaływania pomiędzy receptorem a badanym związkiem. Z tym, że w takim razie należałoby rozważania teoretyczne przeprowadzić na początku rozprawy aby uniknąć syntezy wielkiej ilości związków a wybrać i otrzymać tylko te najlepiej rokujące. Zakładając, że Doktorantka chciała najpierw mieć pulę wyników eksperymentalnych do porównania zależności z siłą wiązania związku z receptorem, należało się spodziewać jakiejś konkluzji wskazującej na dalszy kierunek optymalizacji struktury wyjściowej kolchicyny bazując zarówno na obliczeniach jak i wynikach doświadczeń. Niczego takiego jednak w rozprawie nie znalazłem, zamiast tego ten fragment zawiera opis oddziaływań i próby korelacji pomiędzy eksperymentem w laboratorium z eksperymentem in silico. W takim ujęciu ta część wygląda jakby Doktorantka chciała sprawdzić, czy program dobrze odtwarza wyniki eksperymentalne. Odnosząc się do samych obliczeń chciałbym poprosić Doktorantkę o uzasadnienie wybrania teorii RHF do optymalizacji oddziaływań pomiędzy tubuliną a pochodną kolchicyny. O ile się nie mylę, wykorzystanie tej teorii do obliczeń niesie ze sobą dość istotne konsekwencje w postaci, na przykład krótszych wiązań. W tym przypadku jest to akurat niezwykle istotne, gdyż skrócone wiązania w związku mogą powodować inne układanie się cząsteczki a to może prowadzić do błędnych wyników.

W części badawczej znalazły się też dwa dodatkowe rozdziały. Jeden z nich był poświęcony zależności pomiędzy strukturą otrzymanych pochodnych kolchicyna a ich aktywnością przeciwnowotworową. Drugi rozdział to podsumowanie obejmujące 13 stron. Wydaje mi się, że dyskusja nad zależnością struktura-aktywność była przeprowadzona podczas omawiania aktywności przeciwnowotworowej, natomiast



podsumowanie jest zdecydowanie za długie i poza powtórzeniem tego, co zostało już omówione we wcześniejszych fragmentach pracy nie wnosi nic nowego. Dużo lepsza w tym miejscu wyglądałaby dyskusja nad kierunkami dalszych modyfikacji struktury kolchicyny w celu uzyskania pochodnych o lepszych właściwościach, zwłaszcza że materiał pozwalający na takie dywagacje został przez Doktorantkę zebrany i omówiony.

Strona | 5

Odnosząc się do warstwy edytorsko-językowej należy stwierdzić, że praca od strony edytorskiej została przygotowana starannie, zarówno struktury jak i rysunki są czytelne i wyraźne. Trochę brakuje mi przy schematach reakcji informacji o wydajnościach poszczególnych etapów. Z drobnych uchybień można wskazać, że na Schemacie 1 struktura 2 nie jest karbaminianem, chociaż być nim powinna. Z kolei na Rysunku 15 sygnał przypisany do węgla C11 nie znajduje się we wskazanym miejscu. Jest to formalnie enolanowy atom węgla, na którym powinna być podwyższona gęstość elektronowa (którą można udowodnić rysując odpowiednią formę mezomeryczną), co oznacza przesunięcie w zakresie 110-120 ppm w widmie ^{13}C NMR. W adnotacji do Rysunku 17 wskazuje się obecność widma ^{13}C NMR dla związku 7, którego na tym rysunku nie ma. Odnosząc się do strony językowej rozprawy należy stwierdzić, że została ona napisana poprawnym językiem aczkolwiek tak jak wiele spośród recenzowanych przeze mnie prac cechuje się typowymi mankamentami: nadmiarem znaków przestankowych oraz użyciem słów znanych określanych mianem żargonu. Nie mają one większego wpływu na odbiór pracy i zrozumienie zawartych w niej treści dlatego nie będę ich wyszczególniał.

Podsumowując, rozprawa przygotowana przez mgr Urszulę Majcher-Uchańską dotycząca syntezy pochodnych kolchicyny i badanie ich aktywności przeciwnowotworowej wpisuje się w bardzo ważny trend we współczesnych badaniach poświęconych walce z nowotworami. Z uwagi na złożoność problemu, opracowanie efektywnych metod, terapii oraz substancji zwalczających tego typu schorzenia jest obarczona dużą dawką niepewności jednak wykorzystanie substancji naturalnych o znanej aktywności biologicznej może ten proces w pewnym stopniu przyspieszyć. Zebrany w rozprawie materiał pokazuje pewne podejście, które w przypadku zastosowania odpowiednich narzędzi badawczych oraz odpowiedniego planowania może doprowadzić do uzyskania nowego oręża w walce z tym podstępnyim wrogiem. Wyniki zebrane w rozprawie w wypełniają wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego też wnoszę do Władz Wydziału Chemii Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie rozprawy mgr Majcher-Uchańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.