WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katedra i Zakład Biochemii Wydziału Lekarskiego

Warszawa 02-06-2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Grety Klejborowskiej

„Synteza, badania spektroskopowe i ocena aktywności biologicznej pochodnych związków pochodzenia naturalnego - monenzyny A i kolchicyny"

Oceniana przeze mnie rozprawa Pani mgr Grety Klejborowskiej stanowi zbiór pięciu publikacji i jednego patentu krajowego opublikowanych w latach 2018-2020. Tematem prac jest synteza i badanie aktywności biologicznej pochodnych związków naturalnych: monenzyny A i kolchicyny. Zaproponowany tytuł pracy doktorskiej odpowiada tematyce publikacji i patentu wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a prace są ściśle powiązane tematycznie.

Badania zaprezentowane w pracy Doktorantka realizowała w Zakładzie Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Adama Huczyńskiego.

Prace przedstawione jako cykl do oceny, zostały opublikowane w recenzowanych i cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym o sumarycznym współczynniku oddziaływania Impact Factor 13,496 (najniższy spółczynnik oddziaływania IF to 2.256 a najwyższy 3,926). Warto podkreślić fakt, że w skład cyklu prac Doktorantka włączyła patent krajowy, co daje nadzieje na wdrożenie praktyczne tzw. „myśli naukowej" autorów patentu.

Cykl prac i patentu Doktorantka uzupełniła napisanym po polsku celem pracy, wprowadzeniem, omówieniem wyników i podsumowanie wraz z bibliografią. Każda z zamieszczonych publikacji została uzupełniona o opublikowane w czasopismach Supporting Information, które prezentują dodatkowe dane naukowe uzupełniające publikacje.

Do cyklu prac doktorantka włączyła bardzo dobrze przedstawione wprowadzenie, w którym uzasadnia dlaczego zajęła się syntezą pochodnych naturalnie występujących aktywnych substancji monenzyny A i kolchicyny. Modyfikacja struktury pozwala na otrzymanie związków o wyższej aktywności biologicznej, lepszej rozpuszczalności i biodostępności, jak również wyższej selektywności w stosunku do np. komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi. W dalszej części wprowadzenia mgr Greta Klejborowska

ul. Banacha 1 • 02-097 Warszawa
tel.: (0-22) 5720-693, fax: 5720679 • e-mail: biochemia@wum.edu.pl •

szczegółowo omawia mechanizmy aktywności biologicznej monenzyny A i kolchicyny. Wprowadzenie do cyklu prac i patentu uzupełnione jest o szczegółową bibliografię opartą w większości na publikacjach z ostatniej dekady.

Pierwsze dwie prace z cyklu opisują syntezę i badanie aktywności biologicznej pochodnych monenzyny A. W pierwszej publikacji: **Greta Klejborowska**, Ewa Maj, Joanna Wietrzyk, Joanna Stefańska, Adam Huczyński *"One-pot synthesis and antiproliferative activity of novel double-modified derivatives of the polyether ionophore monensin A"*, **Chemical Biology & Drug Design** 2018; 92:1537-1546; opisano 16 pochodnych węglanowych, w tym 15 podwójnie modyfikowanych pochodnych. Pierwsza pochodna zawierająca w swojej strukturze węglan posiadała wolną grupę karboksylową. Pozostałe pochodne były pochodnymi estrowymi lub amidowymi tej grupy karboksylowej.

W drugiej publikacji: **Greta Klejborowska**, Marta Jędrzejczyk, Natalia Stępczyńska, Ewa Maj, Joanna Wietrzyk, Adam Huczyński; *„Antiproliferative activity of ester derivatives of monensin A at the C-1 and C-26 positions"*, **Chemical Biology & Drug Design** 2019; 94:1859–1864; opisano syntezę i badania 16 pochodnych estrowych monenzyny.

Modyfikacje grupy karboksylowej monenzyny w celu otrzymania pochodnych estrowych były prowadzone na dwa sposoby. Reakcje estryfikacji prowadzono odpowiednimi alkoholami estryfikując grupę karboksylową monenzyny A (C-1) lub regioselektywnego acylowania grupy hydroksylowej w pozycji C-26.

Zastosowane metody pozwoliły Doktorantce otrzymać w sumie 32 pochodne monenzyny A, z czego 22 pochodne zostały otrzymane po raz pierwszy. Tak zróżnicowana grupa pochodnych jest bardzo dobrym materiałem do badań biologicznych. Liczebność i różnorodność grupy pozwala na wyselekcjonowanie najbardziej rokujących pochodnych i wskazanie dalszych dróg możliwych modyfikacji w celu osiągnięcia terapeutycznego celu. Do potwierdzenia struktury i określenia czystości otrzymanych związków wykorzystano szereg technik analitycznych. Zastosowanie techniki ESI-MS pozwoliło na potwierdzenie masy otrzymanych związków. Ponadto dzięki modyfikacji metody i zastosowania kationów metali jednowartościowych i dwuwartościowych wykazano, że związki są zdolne do tworzenia kompleksów o stechiometrii 1:1 zarówno z jedno jak i dwuwartościowymi kationami. W świetle ostatnich doniesień można więc stwierdzić, że właściwości kompleksotwórcze badanych pochodnych monenzyny są zbliżone do właściwości samej monenzyny. Wykorzystanie techniki ESI-MS potwierdziło, że pochodne monenzyny ze zmodyfikowaną grupą karboksylową zachowują swoje właściwości jonoforetyczne

i są zdolne do kompleksowania kationów.

Druga zastosowana metoda FT-IR pozwoliła na potwierdzenie obecności grup funkcyjnych i przesunięć charakterystycznych dla tych grup zależnych od sąsiedztwa w cząsteczce pochodnych monenzyny. Dla pełnej charakterystyki otrzymanych związków wykorzystano spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Wykonano widma ^{1}H NMR i ^{13}C NMR, a dla wybranych pochodnych widma dwuwymiarowe (2D NMR) ^{1}H – ^{1}H COSY, ^{1}H – ^{13}C HETCOR oraz ^{1}H – ^{13}C HMBC. Przeprowadzono również analizę elementarną składu pierwiastkowego związków. Wykonane badania wyczerpująco potwierdziły budowę otrzymanych pochodnych monenzyny A.

Dla wszystkich pochodnych monenzyny zbadano cytotoksyczność względem czterech linii komórek nowotworowych (ludzkiego gruczolaka jelita grubego - LoVo, lekoopornego ludzkiego gruczolaka jelita grubego - LoVo/DX, ludzkiego mięsaka macicy - MES-SA, lekoopornego ludzkiego mięsaka macicy - MES-SA/DS5), a jako kontrolę zastosowano linię komórek prawidłowych (fibroblasty mysie - BALB/3T3). Badania wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu. Wyniki po 72-godzinnej hodowli *in vitro* z zastosowaniem testu SRB wyrażono w postaci IC_{50} (stężenie hamujące wzrost 50% populacji).

Należy podkreślić, że po raz pierwszy sprawdzono cytotoksyczność monenzyny wobec lekowrażliwej (MES-SA) i lekoopornej (MES-SA/DX5) linii ludzkiego mięsaka macicy. Wyznaczone wartości IC_{50} są bardzo niskie – odpowiednio 0,34 μM dla linii MES-SA i 0,16 μM dla linii MES-S/DX5. Wszystkie badane pochodne były aktywne w badanym zakresie stężeń, a wyznaczone wartości stężeń IC_{50} wahały się od wartości submikromolowych do kilkudziesięciu mikromoli. Najbardziej aktywne wobec badanych linii komórkowych były pochodne estrowe modyfikowane w pozycji C-26. Sugeruje to, że odblokowana grupa karboksylowa jest kluczowa do zachowania wysokiej cytotoksyczności pochodnych monenzyny, mimo iż związki z zablokowaną grupą karboksylową również wykazują właściwości jonoforetyczne. Obliczone współczynniki selektywności dla monenzyny A i wszystkich jej pochodnych były większe od 1. Wysokie wartości współczynników selektywności wskazują na dobry potencjał terapeutyczny monenzyny i jej pochodnych. Niskie współczynniki oporności (RI < 1) wskazują na szczególnie dobrą aktywność wobec lekoopornych linii komórkowych.

Monenzyna jest substancją stosowaną w weterynarii jako środek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawskiego

Uniwersytetu Medycznego została sprawdzona zdolność węglanowych pochodnych monenzyny (synteza opisana w pierwszej pracy z cyklu) do hamowania namnażania szczepów bakterii Gram-dodatnich: *Staphylococcus epidermidis* i czterech różnych szczepów *Staphylococcus aureus*. Dwa spośród testowanych związków wykazały znaczącą aktywność wobec badanych szczepów bakterii (MIC = 4,8–21,6 μM).

Podsumowują pierwsze dwie prace z cyklu należy podkreślić, że udział Doktorantki w pracach wynosi 60% i 50% Doktorantka zaprojektowała i przeprowadziła większość syntez, przygotowała próbki to pomiarów spektrofotometrycznych i opracowała analizę wyników. Uczestniczyła w pracach nad manuskryptem, i co ważne sporządziła opis i dyskusję wyników badań biologicznych. Współpraca z biologami, a przede wszystkim dyskusja w temacie budowa chemiczna – aktywność biologiczna pokazuje umiejętność Doktorantki do analizy danych chemicznych i biologicznych.

Pozostałe trzy prace z cyklu:

- **Greta Klejborowska**, Mahshad Moshari, Ewa Maj, Urszula Majcher, Jordane Preto, Joanna Wietrzyk, Jack A. Tuszynski, Adam Huczyński; *„Synthesis, antiproliferative activity, and molecular docking studies of 4-chlorothiocolchicine analogues"* **Chemical Biology & Drug Design** 2020; 95:182–191;

- **Greta Klejborowska**, Alicja Urbaniak, Ewa Maj, Jordane Preto, Mahshad Moshari, Joanna Wietrzyk, Jack A. Tuszynski, Timothy C. Chambers, Adam Huczyński; *„Synthesis,biological evaluation and molecular docking studies of new amides of 4-chlorothiocolchicine as anticancer agents"* **Bioorganic Chemistry** 2020; 97: 103664;

- **Greta Klejborowska**, Alicja Urbaniak, Jordane Preto, Ewa Maj, Mahshad Moshari, Joanna Wietrzyk, Jack A. Tuszynski, Timothy C. Chambers, Adam Huczyński; *„Synthesis,biological evaluation and molecular docking studies of new amides of 4-bromothiocolchicine as anticancer agents"* **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 2019; 27: 115–144;

i patent krajowy (Adam Huczyński, **Greta Klejborowska**, Joanna Wietrzyk, Ewa Maj; *„Pochodne kolchicyny, sposób ich wytwarzania i zastosowanie"* PL231214 (2018)) poświęcone są pochodnym kolcychiny.

W celu podniesienia trwałości układu Doktorantka zastąpiła grupę metoksylową grupą tiometylową przy węglu C-10 kolchicyny.

Otrzymano potrójnie modyfikowane pochodne w pozycjach C-4, C-7 i wcześniej wspomniana C-10. W pozycji 4 wprowadzono brom lub chlor, natomiast przy węglu C-7 grupa aminowa posłużyła do otrzymania ugrupowania utretanowego lub amidowego. W sumie otrzymano 22

pochodne, 8 nowych pochodnych opisano w trzeciej publikacji z cyklu, natomiast następne 14 w publikacji czwartej i piątej. Zwarzywszy na wielkość cząsteczki kolchicyny Doktorantka optymalnie wykorzystała możliwości jej modyfikacji chemicznej.

Budowa otrzymanych pochodnych podobnie jak w pierwszych dwóch pracach została wyczerpująco potwierdzona za pomocą metod spektroskopowych.

Otrzymane pochodne zostały przebadane pod kątem aktywności cytotoksycznej w Instytutucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu i Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock w Stanach Zjednoczonych. Zastosowano szereg linii komórek nowotworowych (pierwotnej ostrej białaczki limfoblastycznej (ALL-5), ludzkiego gruczolaka płuc (A549), ludzkiego gruczolaka piersi (MCF-7), ludzkiego gruczolaka jelita grubego (LoVo)), jako kontrolę zastosowano linię komórek prawidłowych (mysie fibroblasty (BALB/3T3). Wyniki wyrażono w postaci stężenia IC_{50}. Najbardziej aktywne okazały się podwójnie modyfikowane pochodne oraz potrójnie modyfikowane pochodne z krótkimi podstawnikami w pozycji C-7, a wartości IC_{50} dla najbardziej aktywnych związków mieściły się w zakresach: 2,3 – 8,7 nM wobec linii komórkowej ALL-5, 9,4 – 21,5 nM wobec linii A549, 11,2 – 21,5 nM wobec linii MCF-7, 6,6 – 13,4 nM wobec linii LoVo. Dla części badanych związków obliczone współczynniki selektywności SI i były bardzo korzystne. Warto podkreślić, że dla czterech pochodnych dobre współczynniki SI korelują z bardzo niskimi wartościami IC_{50}.

W Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock w Stanach Zjednoczonych najbardziej aktywne pochodne poddano badaniom cyklu komórkowego. Do badań wytypowano komórki ostrej białaczki limfoblastycznej i ludzkiego gruczolaka piersi. Kolchicyna oraz jej analogi powodują śmierć mitotyczną w komórkach ludzkiego gruczolaka piersi, a w komórkach pierwotnej ostrej białaczki limfoblastycznej nie powodują zatrzymania mitozy lecz indukują bezpośrednią śmierć komórkową w interfazie G1.

Dodatkowo dla kolchicyny i jej pochodnych w Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton w Kanadzie wykonano dokowanie molekularne. które pozwala na przewidywanie ułożenia liganda w miejscu wiążącym receptora białkowego.

Badania dokowania molekularnego pokazały, że pochodne kolchicyny dobrze oddziałują z kolchicynowym miejscem wiążącym (CBS), potwierdzając tym samym mechanizm działania tych związków na komórki nowotworowe. Korelacje pomiędzy danymi

obliczeniowymi uzyskanymi w badaniach *in silico* oraz danymi eksperymentalnymi uzyskanymi w badanich *in vitro*, nie zawsze były idealne. Przyczyną może być bardziej skomplikowany mechanizm oddziaływania na komórki nowotworowe, w którym poza samą strukturą związku. na jego aktywność ma również wpływ przenoszenie przez błony, lipofilowość, rozpuszczalność czy oddziaływanie z innymi białkami. Co pokazuje, że badania teoretyczne, o coraz większych mocach obliczeniowych, nie zastąpią pracy chemika i biologa w laboratorium.

Podsumowują trzy prace w cyklu poświęcone pochodnym kolchicyny należy podkreślić, że udział Doktorantki w pracach wynosi 45% w trzeciej a 35% w dwóch pozostałych. Doktorantka przeprowadziła większość syntez, przygotowała próbki to pomiarów spektrofotometrycznych i opracowała analizę wyników. Uczestniczyła w pracach nad manuskryptem, koordynowała korespondencję ze współautorami publikacji, a także brała aktywny udział w dyskusji z recenzentami.

Posumowanie:

Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów np. str. 31 moenyny zamiast monenzyny, ale w żaden sposób nie umniejsza to wartości przedstawionej rozprawy.

Wprowadzenie, omówienie wyników i podsumowanie jest napisane w sposób zwięzły, czytelny. Należy podkreślić, że cykl prac i patentu jest zwarty tematycznie. Zaprezentowane wyniki badań wnoszą nowe elementy w rozwój reprezentowanej dyscypliny naukowej.

Mgr Greta Klejborowska posiada znaczący, bardzo wartościowy dorobek naukowy, mieszczący się w głównym nurcie współczesnych badań. Szereg badań będących podstawą osiągnięcia naukowego ma charakter nowatorski i posiada zarówno walory poznawcze jak i praktyczne. Przedstawione prace pokazują że, Doktorantka posiada ogromne doświadczenie laboratoryjne, zdolność do nawiązywania współpracy, zwłaszcza międzynarodowej, oraz pozyskiwania funduszy na badania naukowe (kierownik jednego projektu NCN i wykonawca 4 projektów). Cechuje ją duży potencjał twórczy.

Biorąc pod uwagę przedstawiony cykl prac i patent, jak również całkowity dorobek naukowy Doktorantki wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Grety Klejborowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jej rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
prof. dr hab. n. med. Marta Struga

ul. Banacha 1 • 02-097 Warszawa
tel.: (0-22) 5720-693, fax: 5720679 • e-mail: biochemia@wum.edu.pl •