



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

KATEDRA BIOCHEMII I CHEMII KLINICZNEJ
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND CLINICAL CHEMISTRY

dr hab. Marta Struga

Warszawa, 12.05.2016 r.

Katedra Biochemii i Chemii Klinicznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Michała Antoszczaka „Synteza, badania strukturalne i spektroskopowe oraz aktywność przeciwnowotworowa i przeciwdrobnoustrojowa nowych pochodnych salinomycyny” wykonanej w Pracowni Chemii Biorganicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Promotor pracy – prof. dr hab. Adam Huczyński

Choroby nowotworowe stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów. Liczba zachorowań rośnie w zastraszającym tempie. W 2000 roku na świecie zarejestrowano 10 mln nowych zachorowań, w Polsce 110 tys. Prognozy na rok 2020 są pesymistyczne; szacuje się, iż nowych zachorowań na świecie będzie 20 mln., zaś w samej tylko Polsce 160 tys. Chorzy na nowotwory posiadają obniżoną odporność, wskutek czego są szczególnie narażeni na wszelkiego rodzaju infekcje, w tym szczególności na infekcje bakteryjne. Jak wynika z raportu prof. Ramanana Laxminarayan'a, dyrektora Centre for Disease Dynamics, Economics and Policy w Waszyngtonie, chemioterapeuci, jako druga grupa lekarzy zaraz po chirurgach, bardzo często spotykają się z opornością na antybiotyki. Występuje ona u co czwartego chorego poddanego chemioterapii. Ostatni raport opublikowany we wrześniu w „Lancet” podaje, iż połowa bakterii odpowiedzialnych za zakażenia pooperacyjne jest oporna na antybiotyki. Oporność na bakterie nie oznacza jednak, że chorych nie udaje się skutecznie leczyć, lekarzom zwykle udaje się znaleźć skuteczny antybiotyk dla danego pacjenta. Leczenie trwa jednak znacznie dłużej i jest bardziej kosztowne. Zdarza się jednak, że części pacjentów nie udaje się uratować. Raport podaje

ponadto, że dalszy spadek skuteczności antybiotyków o 30 proc., przyczyniłby się do wzrostu zachorowań na zakażenia bakteryjne oporne na antybiotyki o 120 tys. rocznie w samych Stanach Zjednoczonych. Jednocześnie, roczna liczba zgonów z tego powodu zwiększyłaby się o 6 tys.

W odpowiedzi na zagrożenia spowodowane narastającą odpornością bakterii na stosowane leki, w czołowych laboratoriach badawczych prowadzi się intensywne badania w poszukiwaniu nowych związków o silnej aktywności przeciwbakteryjnej.

Poszukiwania te mogą odbywać się na kilka sposobów. Podejście tradycyjne polega na przetestowaniu kilku tysięcy substancji z nadzieją, iż wśród nich trafi się na strukturę aktywną. W dzisiejszych czasach mówimy o racjonalnym projektowaniu leków.

Praca Pana Michała Antoszczaka jest przykładem racjonalnego projektowania i udowadnia, że tradycyjna synteza chemiczna wciąż jeszcze ma sens, gdy dobrze wybierzemy substrat do takiej syntezy. Doskonale też wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej o strukturach innych niż dotychczas stosowane leki.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Zawiera cel pracy, część teoretyczną, badania własne, opisujące syntezę badania spektroskopowe, aktywność biologiczną oraz podsumowanie otrzymanych wyników.

Część wprowadzająca jest poświęcona charakterystyce antybiotyków jonoforowych, a w szczególności salinomycynie. Autor opisuje aktywność przeciwnowotworową salinomycyny oraz mechanizm działania i toksyczność.

Celem badań własnych Doktoranta było opracowanie wydajnych metod selektywnej modyfikacji chemicznej salinomycyny, dzięki którym możliwe byłoby otrzymanie nowych pochodnych charakteryzujących się wyższą aktywnością biologiczną, które w przyszłości mogłyby znaleźć zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe jak i przeciwbakteryjne.

Jako substrat do syntez doktorant zastosował czystą salinomycynę. Opracował metodę jej pozyskiwania z dodatków paszowych oraz metody jej oczyszczania, co pozwoliło znacznie obniżyć koszty prowadzonych badań.

W ramach swojej pracy doktorant otrzymał 66 pochodnych salinomycyny z grupy amidów, estrów oraz *O*-acylowych (pozycja C20) pochodnych.

Do syntezy amidów autor zastosował kwas salinomycyny, odpowiednią aminę w obecności DCC (*N,N*- dicykloheksylokarbodimidu), jako czynnika sprzęgającego oraz HOBt (hydroksybenzotriazol) jako aktywatora reakcji, co podwyższa wydajność procesu.

Syntezę estrów doktorant prowadził dwoma drogami. W pierwszej metodzie wykorzystał alkohole w obecności DCC, PPy (polipirolu), katalizatora przenoszenia grup acylowych oraz kwasu *p*-toluenosulfonowego, będącego aktywatorem DCC.

W drugiej metodzie używał chlorek lub bromek alkiłowy, w obecności DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en). Obie zastosowane metody dawały oczekiwane produkty z zadawalającą wydajnością.

Doktorant nie ograniczył swojej pracy syntetycznej do metod opracowanych w swoim zespole badawczym, ale uczestniczył w stażu, gdzie opanował metodę syntezy *O*-acylowych pochodnych grupy hydroksylowej salinomycyny w pozycji C(20).

Budowę nowych pochodnych salinomycyny potwierdzono za pomocą metod spektroskopowych: ¹H NMR, ¹³C MNR, 2D MNR, jak i FT-IR. Dla 13 pochodnych, o dobrej jakości kryształów, wykonano analizę rentgenograficzną, co pozwoliło jednoznacznie wyznaczyć strukturę związków, a także oddziaływania pomiędzy cząsteczkami w ciecie stałym. Ustalono, że dla większości badanych pochodnych struktura pseudocykliczna w ciecie stałym została zachowana w roztworze, co potwierdziły badania spektroskopowe i jest ona bardziej aktywna biologicznie od formy liniowej.

Autor przeprowadził reakcje kompleksowania otrzymanych pochodnych salinomycyny z kationami metali pierwszej i drugiej grupy. Wykazał, że przekształcenie salinomycyny w amidy oraz estry wpływa na jest zdolność do tworzenia kompleksów.

Z punktu widzenia przyszłego ewentualnego zastosowania praktycznego, szczególnie interesujące są badania biologiczne otrzymanych pochodnych.

Otrzymane pochodne poddano badaniom przeciwdrobnoustrojowym. Szczególnie interesująca jest aktywność wobec szczepów (standardowych i klinicznych) gronkowca złocistego, włączając szczepy biofilmotwórcze. Najbardziej aktywna pochodna E3 (ester 2,2,2-trifluoroetylowy) wykazywała MIC (minimalne stężenie hamujące) w granicach od 0.5 – 4 µg/ml dla szczepów gronkowca złocistego metycylinoopornych jak i metycylinowrażliwych. Związek charakteryzował się wyższą aktywnością niż wyjściowa salinomycyna jak i stosowana jak wzorzec ciprofloksacyna.

Wszystkie otrzymane nowe związki poddano badaniom pod kątem aktywności cytostatycznej wobec ludzkich linii komórek nowotworowych, w tym komórek lekoopornych. Wszystkie pochodne salinomycyny były aktywne cytostatycznie. Na uwagę zasługuje aktywność wobec komórek nowotworowych linii LoVo/DX (doksorubicynoopornego gruczolaka okrężnicy). Z przeprowadzonych badań wynika, że wybrane pochodne salinomycyny przełamują oporność wielolekową dla tej linii komórek, a jednocześnie są przynajmniej dwukrotnie mniej cytotoksyczne wobec komórek prawidłowych (zarodkowe mysie fibroblasty).

Autor w swojej pracy szczegółowo opisał jak na aktywność badanych związków wpływają zmiany struktury, co wiąże się ze zmianą podstawników w otrzymanych amidach i estrach. Badania te mogą być szczególnie istotne przy planowaniu przyszłej pracy syntetycznej. Przeprowadzone badania stanowiły materiał do napisania 8 publikacji naukowych. Wszystkie z wymienionych publikacji charakteryzują się współczynnikiem oddziaływania IF powyżej 2. Gdy więc podsumujemy współczynnik oddziaływania IF dla dzieła naukowego, będącego zbiorem publikacji, to sumaryczny wynik wykracza poza minimalne normy dorobku ustalone przez wiodące polskie uniwersytety (np. Warszawski Uniwersytet Medyczny) pozwalające wszcząć przewód habilitacyjny. Warto podkreślić, że prace badawcze były finansowane z grantów, których Doktorant był wykonawcą.

Reasumując, uważam iż praca magistra Michała Antoszczaka jest przykładem bardzo dobrze zaplanowanej i wykonanej pracy badawczej. Praca napisana jest starannie i nie budzi zastrzeżeń pod względem merytorycznym. Nie jest wolna od błędów edytorskich. Brak w pracy wykazu skrótów, co znacznie ułatwiłoby czytanie pracy. Natomiast załączenie oryginalnych publikacji do pracy, jako suplement, pozwoliłyby sprawniej porównać materiał w nich zawarty z rozprawą doktorską.

Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uważam ją za niezwykle interesującą oraz nowatorską, w pełni spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie magistra Michała Antoszczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz nadanie tytułu doktora nauk chemicznych.

Ponadto, mając na uwadze wkład pracy Doktoranta, wnoszę do Wysokiej Rady wniosek o wyróżnienie rozprawy.

ADIUNKT
Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej

dr hab. n. farm. Marta Struga
