

Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Katedra i Zakład Chemii Medycznej

80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1

tel. (+48 58) 349 14 50

fax (+48 58) 349 14 56

Recenzja pracy doktorskiej mgr Elżbiety Magdaleny Wnuk

**pt.: „SYNTEZA NOWYCH POCHODNYCH 9,10-ANTRACHINONU
ZAWIERAJĄCYCH HETEROCYKLIKALNE FRAGMENTY AMIN
ORAZ BADANIE WŁAŚCIWOŚCI ELEKTROCHEMICZNYCH,
. SPEKTROSKOPOWYCH I BIOLOGICZNYCH
WYBRANYCH POCHODNYCH”**

Doksorubicyna, należąca do grupy antracyklin, jest aktywnym biologicznie metabolitem *Streptomyces peucetius* ver. *caesus*, używanym klinicznie jako efektywna cząsteczka przeciwnowotworowa w leczeniu chorób onkologicznych u dzieci i dorosłych. Amerykańskie Towarzystwo Kardiologiczne uznało antracykliny za jeden z najważniejszych czynników ryzyka w patogenezie dysfunkcji mięśnia sercowego.¹ Kardiomiopatia będąca skutkiem ubocznym stosowania antracyklin może przebiegać bezobjawowo ale może także manifestować się nawet ciężką niewydolnością mięśnia sercowego. Rokowanie w kardiomiopatii poantracyklinowej jest istotnie gorsze niż nawet w pozawałowej

¹ Circulation. 2008 May 13;117(19):2544-65. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.188965. Epub 2008 Apr 7. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. Schocken DD¹, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB, Hong Y;

czy idiopatycznej.² Biorąc powyższe pod uwagę tematyka prezentowanej pracy doktorskiej Pani mgr Eweliny Magdaleny Wnuk wpisuje się w niezwykle palący problem z zakresu chemii medycznej antracyklin, biologii nowotworów i onkologii

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalną pracą doświadczalną poświęconą nowym aspektom syntezy pochodnych 9,10-antrachinonu wykazujących wysoką aktywność przeciwnowotworowa przy jednoczesnym zmniejszeniu cytotoksyczności wobec zdrowych, nietransformowanych fibroblastów. Godnym uwagi wydaje się być fakt iż oceniana dysertacja jest kontynuacją bardzo ciekawych badań prowadzonych przez Zespół Pana Promotora nad syntezą nowych chemioterapeutyków i mechanizmami ich biologicznej aktywności.

Rozprawa zawiera 174 strony tekstu, w tym 48 rycin, 24 tabele oraz 160 aktualnych pozycji piśmiennictwa. Na uznanie zasługuje dodatkowe wykazy tabel i rycin w formie suplementów (str. 211-212 rozprawy). Struktura całości tekstu jest typowa dla rozpraw doktorskich. Obszerny wstęp rozprawy, nazwany częścią literaturową, poprzedzony jest wykazem używanych skrótów i symboli, spisem treści oraz zwięzłym, dwustronicowym wprowadzeniem. Składa się z 6-ciu rozległych podrozdziałów. Przedstawia rozległy stan wiedzy na temat chinonów, antrachinonów i ich pochodnych w aspekcie budowy, właściwości biologicznych i farmakologicznych. Doktorantka opisuje szczegółowo właściwości biologiczne i farmakologiczne piperydyny i piperazyny wraz z ich pochodnymi. Kolejne rozdziały obejmują cele pracy, rozbudowaną część eksperymentalną zawierającą uwagi wstępne, opis syntez 31 pochodnych antrachinonu oraz metod oceny ich cytotoksyczności *in vitro* na hodowlach komórkowych. Kolejny podrozdział to badania fizykochemiczne, elektrochemiczne – voltamperometria cykliczna i badania spektroskopowe. gdzie oznacz używanych metod , wyniki oraz wynikającą z nich dyskusję, która prowadzi do wniosków końcowych ujętych w podsumowaniu.

Z uwagi na udokumentowane działania przeciwnowotworowe doksorubicyny i daunorubicyny – antracyklin zawierających w swojej strukturze pierścień antrachinonu

² N Engl J Med. 2000 Apr 13;342(15):1077-84. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. Felker GM¹, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK.

Doktorantka zaproponowała syntezę nowych pochodnych poprzez połączenie kilku struktur cząsteczek aktywnych o znanych właściwościach farmakologicznych. Nowe związki będące pochodnymi 9,10-antrachinonu zostały wzbogacone o fragmenty heterocykliczne dodatkowo modyfikowane chemicznie w celu uzyskania wysokiej skuteczności przeciwnowotworowej przy równoczesnej próbie minimalizacji toksyczności wobec komórek nietransformowanych. Projektowane syntezę podzielono wstępnie na 6 różnych etapów, w tym:

1. Opracowanie metody otrzymywania i izolacji serii piperydynowych pochodnych 9, 10-antrachinonów zawierających w swej strukturze jedną bądź dwie cząsteczki piperydiny oraz zawierające jedną cząsteczkę piperydiny i atom chloru.
2. Opracowanie metody otrzymywania i izolacji serii piperazynowych, pochodnych 9, 10-antrachinonów zawierających w swej strukturze jedną bądź dwie cząsteczki piperazyny oraz zawierające jedną cząsteczkę piperazyny i atom chloru.
3. Opracowanie metody otrzymywania i izolacji wielkocząsteczkowych układów molekularnych zawierających w swej strukturze dwa lub trzy pierścienie 9,10-antrachinonu połączone ze sobą cząsteczkami piperazyny oraz zakończone w pozycji 1- pierścienia 9, 10-antrachinonu cząsteczką piperazyny lub atomem chloru.
4. Opracowanie metod preparatywnych umożliwiających modyfikację układu piperazynowego przyłączonego do struktury 9,10-antrachinonu dodatkowymi ugrupowaniami w postaci grup karboksylowych, metylowych oraz grupy benzylovej.
5. Opracowanie skutecznej metody przyłączania aminokwasów do atomu azotu znajdującego się w pozycji 4- pierścienia piperazyny w strukturze 1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu.

Zaplanowano do syntezy aminokwasy w następującej postaci:

- a) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH;
- b) Fmoc-Arg(Pbf)-OH;
- c) Fmoc-His(Trt)-OH;
- d) Fmoc-Glu(OtBu)-OH;
- e) Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
- f) Fmoc-Asn(Trt)-OH;
- g) Fmoc-Gln(Trt)-OH;
- h) Fmoc- Ser(tBu)-OH.

6. Zoptymalizowanie metody syntezy dipodstawionych pochodnymi 9,10-antrachinonu zawierających w pozycji 1- pierścienia 9,10-antrachinonu grupę hydroksylową oraz w pozycji 4-, 5- lub 8- pierścienia 9,10-antrachinonu cząsteczkę piperazyny.

Założeniem prezentowanej dysertacji jest otrzymanie molekuł charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwaproliferacyjną, przy jednocześnie zmniejszonej toksyczności wobec komórek prawidłowych. W związku z powyższym, uzyskane na drodze syntezy nowe pochodne zostały poddane testom na hodowlach komórkowych, w oparciu o testy przeżywalności MTT i SRB

W dalszej części dla molekuł charakteryzujących się najlepszą aktywnością przeciwaproliferacyjną zostały przeprowadzone badania fizykochemiczne obejmujące woltamperometrię cykliczną oraz spektroskopię UV -Vis.

Zastosowane metody statystyczne umożliwiły wiarygodną ocenę uzyskanych wyników. Wstęp, cele pracy, materiały i metody w umiejętny sposób wprowadzają czytelnika w założenia badawcze Doktorantki oraz cele projektowanych i przeprowadzonych badań.

W uwagach wstępnych części eksperymentalnych Doktorantka omówiła chromatografię kolumnową oraz wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Otrzymane pochodne antracyklin zidentyfikowano na podstawie widm $^1\text{H-NMR}$, widm IR oraz widm masowych MALDI-TOF. W opinii recenzenta cześć syntetyczna i jej opis stanowią bardzo mocną stronę pracy, a tabela 14-ta, zestawiająca poszczególne pochodne oczyszczane z wykorzystaniem HPLC, umożliwi szybkie odnalezienie interesujących informacji.

Oczyszczone substancje były testowane na klasycznych, ustalonych liniach komórkowych - ludzkiej ostrej białaczki promielocytarnej HL-60 oraz jej klonie opornym na mitoxantron przy użyciu metody MTT oraz komórkach wywodzących się z ludzkiego gruczołka jelita grubego - LoVo oraz ich klonie opornym na doksorubicynę przy pomocy metody SRB. Jako model komórek nietransformowanych używano komórek mysich fibroblastów BALB/3T3, ilość adherentnej masy komórkowej oznaczano również metodą SRB. Po wykonaniu testów cytotoksycznych obliczano wartość IC_{50} oraz indeks oporności.

W wyniku analizy aktywności antyproliferacyjnej syntetyzowanych antrachinonów pozwoliła Doktorantce wybrać grupę 9-ciu związków o interesujących właściwościach.

Spośród otrzymanych przeze mnie molekuł najciekawsze właściwości przeciwproliferacyjne wykazywały pochodne

1-(piperdyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 1),
1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 6),
1,5-di(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 8),
5,5'-(piperazyn-1,4-di-ylo)di(1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu) (S - 12),
5,5'-((9,10-antrachinon-1,5-di-ylo)di(piperazyn-4,1-di-ylo))-
-di(1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu) (S 13),
8,8'-(piperazyn-1,4-di-ylo)di(1-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu) (S - 14),
1-hydroksy-4-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 29),
1-hydroksy-5-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 30),
1-hydroksy-8-(piperazyn-1-ylo)-9,10-antrachinonu (S - 31).

Powyższe pochodne scharakteryzowano pod względem elektrochemicznym.

Do przykrych obowiązków recenzenta należy analiza błędów i uchybień dysertacji. Na szczęście recenzent nie zauważył zbyt wielu przewinień. Na stronie 44-tej Dysertacji Doktorantka analizując rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych użyła zwrotu „nowotwory zakazają inne narządy” jest to termin z zakresu mikrobiologii ale nie onkologii.

Recenzentowi brakuje eksperymentów umożliwiających ocenę kardiotoksyczności pochodnych antrachinonu. Użycie nowotworowych linii komórkowych i fibroblastów nie jest wystarczające. Niestety Doktorantka nie przeanalizowała jeszcze oddziaływania tych związków z DNA. Doktorantka pominęła publikacje wiążące toksyczność antrachinonów z mitochondrialną akumulacją żelaza.^{3,4} Analiza publikacji z ostatnich 2-ech lat wskazuje

³ J Clin Invest. 2014 Feb;124(2):617-30. doi: 10.1172/JCI72931. Epub 2014 Jan 2. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, Mutharasan RK, Naik TJ, Ardehali H.

⁴ Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 10;18(8):899-929. Epub 2012 Oct 12. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. Stěrba M¹, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, Šimůnek T.

iż punktem uchwytu działania doksorubicyny w mitochondriach komórki nie musi być DNA lecz kardiolipina.⁵ Sugestia którą Doktorantce podsuwa recenzent jest o tyle istotna, że nie tylko serce ale i komórki nowotworowe zawierają kardiolipinę, której skład chemiczny koreluje ze zdolnością komórek nowotworowych do proliferacji.⁶ Byłoby interesujące dowiedzieć się czy nowo otrzymane pochodne antrachinonów będą różniły się zdolnością do tworzenia kompleksów z kardiolipiną.⁷ W 2014 roku do listy potencjalnych przyczyn kardiotoxyczności doksorubicyny dołączono oksydacyjną modyfikację MyBP-C (sercowego białka C wiążące miozynę).⁸

Powyższe uwagi odnośnie uchybień Dysertacji mają na celu ukierunkowanie dociekań Doktorantki na poszerzenie bazy wyników z zakresu oddziaływań antrachinonów z istotnymi biomolekułami. Próby poszukiwania innych targetów molekularnych oddziałujących z antrachinonami wpisują się w słynne zdanie Arthura Kornberga definiujące biologię jako „chemię w działaniu”.

Powyższe uchybienia rozprawy i uwagi recenzenta w niczym nie obniżają zasadniczej wartości recenzowanej pracy, która zawiera niekwestionowany element nowości naukowej. Praca napisana jest przystępnie co sprawiło iż czytałem ją z wielką przyjemnością. W podsumowaniu chciałbym zaznaczyć i przedstawić mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Elżbiety Magdaleny Wnuk oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka wykazała

⁵PLoS One. 2016 Jul 19;11(7):e0158376. doi: 10.1371/journal.pone.0158376. eCollection 2016. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. Aryal B¹, Rao VA¹.

⁶ Mol Cell Biochem. 2015 Dec;410(1-2):175-85. doi: 10.1007/s11010-015-2549-1. Epub 2015 Aug 28. Cardiolipin composition correlates with prostate cancer cell proliferation. Sapandowski A¹, Stope M², Evert K³, Evert M³, Zimmermann U², Peter D¹, Päge I¹, Burchardt M², Schild L⁴.

⁷ Biophys Chem. 1990 Apr;35(2-3):247-57. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. Goormaghtigh E¹, Huart P, Praet M, Brasseur R, Ruyschaert JM.

⁸ Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 4;111(5):2011-6. doi: 10.1073/pnas.1321783111. Epub 2014 Jan 21. Doxorubicin-induced carbonylation and degradation of cardiac myosin binding protein C promote cardiotoxicity. Aryal B¹, Jeong J, Rao VA.

dużą dojrzałość w stawianiu pytań i poszukiwaniu na nie odpowiedzi, poprzez umiejętne zaplanowanie badań, zastosowanie odpowiednich metod, wnikliwą analizę wyników i ostrożną, właściwie prowadzoną dyskusję. Mając powyższe na uwadze stwierdzam, iż recenzowana praca spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym **proszę Radę Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Elżbiety Magdaleny Wnuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Z uwagi na wysoką merytoryczną wartość pracy i zgłoszenia patentowe wnoszę o wyróżnienie nagrodą rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej

prof. dr hab. med. Michał Woźniak

