

Dr hab. inż. Julia Gibka
Instytut Podstaw Chemii Żywności
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Jakuba Szerszenowicza

**pt. „Synteza na podłożu stałym i ocena aktywności przeciwnowotworowej
analogów netropsyny i bis-netropsyny”**

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. Danuty Drozdowskiej

Nowotwory są bardzo częstą przyczyną zgonów w Polsce. Rak gruczołu piersiowego stanowi jeden z głównych problemów zdrowotnych. Jest jednym z najgroźniejszych nowotworów. Ważna jest wczesna diagnoza, profilaktyka, ale też bardzo ważne w przypadku zachorowania jest trwałe wyleczenie. Pomimo rosnącej ilości trwałych wyleczeń, przy jednocześnie rosnącej zapadalności na raka sutka, ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych skutecznych leków bez ryzyka nawrotu choroby. Chemioterapia odgrywa ważną rolę w leczeniu nowotworów. Wśród wielu stosowanych leków spotyka się też mało skuteczne, o działaniach niepożądanych, dlatego też badania nad poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych są wyzwaniem dla naukowców.

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej magister Jakub Szerszenowicz podjął niezwykle ważne z teoretycznego ale i praktycznego punktu widzenia, poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych, modyfikując strukturę netropsyny. Synteza i badanie aktywności biologicznej nieznanych dotychczas analogów netropsyny jest interesującym zagadnieniem, gdyż stosunkowo prosta struktura związku, w połączeniu z szeroką aktywnością biologiczną daje szansę na znalezienie cząsteczki działającej skutecznie przeciwnowotworowo.

W omawianej pracy Doktorant dla zsyntetyzowanych przez siebie związków określił aktywność antyproliferacyjną wobec dwóch standardowych linii komórkowych raka piersi i zdrowych komórek nabłonka gruczołu piersiowego.

Rozprawa doktorska mgr Jakuba Szerszenowicza ma układ typowy, zawiera 126 stron, składa się z 12 rozdziałów, w kolejności: cel pracy, wstęp, przegląd literatury, badania własne, część eksperymentalna, wyniki i ich dyskusja, wnioski, streszczenie (również w języku angielskim), atlas 48 widm ^1H NMR i ^{13}C , spis literatury oraz aneks zawierający

trzy tabele prezentujące przeżywalność badanych komórek raka piersi i komórek zdrowych. Całość uzupełniona jest 46 rysunkami, 7 tabelami i 2 zdjęciami. Autor w pracy cytuje 147 pozycji piśmiennictwa, w większości z ostatnich lat.

Doktorant jasno sprecyzował cel pracy. Opracował plan jego realizacji, obejmujący dwie części: syntetyczną, dotyczącą otrzymywania pochodnych netropsyny wg znanych procedur, oraz część biologiczną dotyczącą badania aktywności przeciwnowotworowej otrzymanych związków.

We wstępie pracy Doktorant wskazał na celowość podjęcia badań wg przyjętego planu, wykorzystując jako modelową cząsteczkę netropsyny. Netropsyna jest naturalnym oligopeptydem charakteryzującym się aktywnością przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwwirusową i cytostatyczną. Jednak ze względu na dużą toksyczność, również wobec komórek zdrowych, nie znalazła ona zastosowania w terapiach przeciwnowotworowych.

Wiadomo, że nawet niewielka zmiana struktury cząsteczki może powodować istotne zmiany w aktywności biologicznej. Mając to na uwadze, Doktorant zaprojektował bibliotekę 16 analogów netropsyny i 8 analogów bis-netropsyny, oczekując otrzymania struktur o aktywności przeciwnowotworowej. Jednym z kierunków modyfikacji struktury związków modelowych jest zastąpienie pierścieni pirolowych benzenowymi, co ułatwia syntezę i pozwala uzyskać z większą wydajnością trwalsze, korzystniej działające produkty niż netropsyna. Zainspirowało to Doktoranta do podjęcia badań nad nowymi analogami netropsyny.

W części literaturowej Doktorant omówił dokładnie przestrzenną budowę cząsteczki netropsyny, opis wzbogacił kolorową ilustracją. Dokonał starannego przeglądu literatury (od 1951 roku) dotyczącego aktywności biologicznej netropsyny. Przedstawił aktualny stan wiedzy o mechanizmie oddziaływania netropsyny z DNA. W tej części pracy scharakteryzował znane analogi netropsyny, mianowicie leksitropsyny, kombileksyny, bis-netropsyny oraz poznane w ostatnich latach proximycyny, pochodne antrapirazolowe, pochodne pirolomocznika i pirolokarbonylomocznika, leksitropsyny antracenoizoksazolowe, izonetropsyny, tiazotropsyny. Autor dokonał analizy opisanej struktury 45 związków, wskazał na różnice w ich budowie i aktywności biologicznej w tym przeciwnowotworowej. Sporo miejsca poświęcił na omówienie zależności pomiędzy strukturą analogów netropsyny a ich aktywnością biologiczną.

Wysoko oceniam wyczerpujące omówienie opisanych w literaturze efektów badań nad modyfikacją struktur netropsyny, świadczące o dobrym rozeznaniu tematu pracy.

Szkoda, że tej części pracy nie zakończył Autor tabelą pokazującą struktury omawianych związków i ich aktywność biologiczną. Ułatwiłoby to czytelnikowi śledzenie tych zależności.

Doktorant wskazał na zalety znanej od 1963, metody Merrifielda syntezy peptydów na fazie stałej, którą wykorzystał w swoich badaniach. Wyjaśnił też znaczenie apoptozy i nekrozy w etiologii wielu chorób m.in. nowotworowych i poszukiwaniu nowych modyfikacji leków.

Zasadniczą częścią pracy jest rozdział „Badania własne”. Doktorant przedstawił zwięzły ale bardzo czytelny opis 6 etapów syntezy analogów netropsyny i bis-netropsyny, metody badania ich czystości i potwierdzania struktury oraz badań aktywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo sposób postępowania zaprezentował na schemacie ogólnym, zaś w tabeli 1 i 2 przedstawił struktury substratów i 24 docelowych produktów. Strukturę tych związków potwierdził metodą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego protonów i jąder izotopu węgla ^{13}C .

Syntezy związków wykonywał w sposób równoległy, metodą półautomatyczną w reaktorze SYNCORE na podłożu z żywicy Wanga.

Pozytywnie oceniam sposób syntezy i cykl zaplanowanych przez Doktoranta reakcji. Reaktor Syncore zapewnia stałe, jednolite warunki reakcji, umożliwia kontrolowanie parametrów i wykonywanie poszczególnych operacji jednocześnie dla wszystkich prowadzonych reakcji.

Do oceny oddziaływania zsyntetyzowanych pochodnych netropsyny i bis-netropsyny z DNA (plazmid pBR322) Doktorant wykorzystał metodę fluorescencyjną. W badaniu tym ocenił zmianę fluorescencji kompleksu interkalującego bromku etydyny z DNA po inkubacji z zsyntetyzowanymi związkami. Związki oddziałując z DNA wypierają interkalator z kompleksu i powodują zmniejszenie fluorescencji. Fluorescencję mierzono za pomocą spektrofotometru UV-VIS Tecan Infinite M200, przy długości fali wzbudzenia 546 nm oraz długości fali emisji 595 nm. Otrzymane wartości posłużyły do obliczenia stopnia wygaszania fluorescencji przez badane związki.

Badanie aktywności przeciwnowotworowej *in vitro* otrzymanych związków, Autor zaplanował z wykorzystaniem znanych, szeroko stosowanych w celach scriningowych, linii komórkowych raka piersi MCF-7, MDA-MB-231 i zdrowych komórek gruczołu piersiowego MCF-10A. Pomiar przeżywalności komórek wykonano metodą cytometrii przepływowej przy zastosowaniu testu z Aneksyną-V-Fluos i jodkiem propidyny. Wyniki potwierdzono metodą mikroskopową stosując barwienie wg Wright-Giemsa z zastosowaniem testu Fischer Leuko Stat Kit. Do obliczania stężeń związków, przy których przeżywa połowa komórek, zarówno

na drodze apoptozy jak i nekrozy, czyli wartości IC_{50} , zastosował funkcję zapisaną w programie Excel Office firmy Microsoft.

Z przekonaniem mogę pochwalić również strukturę zaplanowanych badań biologicznych i wybór metod określania aktywności przeciwnowotworowej. Prawidłowo dobrane metody i dokładne ich omówienie świadczą o dobrej znajomości procedur poszukiwania leków przeciwnowotworowych.

W części eksperymentalnej pracy na podkreślenie zasługują przejrzyste schematy syntezy związków bibliotek 1-6. Pozwalają one czytelnikowi śledzić kolejne etapy przekształcania substratów poprzez półprodukty do docelowych analogów netropsyny i bis-netropsyny. Doktorant jako substraty wykorzystał aromatyczne nitroaminy, zawierające pierścienie pirydyny, pirymidyny, tiazolu, benzeny, które grupą aminową wiązały się z żywicą Wanga. Grupę nitrową poddawał kolejnym reakcjom redukcji i acylowania, w wyniku czego otrzymał 12 nowych pochodnych netropsyny zawierających w strukturze 2 pierścienie aromatyczne (+1 benzenowy), 4 pochodne zawierające w strukturze 3 pierścienie aromatyczne (+2 benzenowe) i 8 nowych pochodnych bis-netropsyny z 4 pierścieniami aromatycznymi (+2 benzenowe).

Substraty stanowią terminalny fragment cząsteczek nowych pochodnych netropsyny, zaś drugi koniec stanowią fragmenty N,N-dimetylobutyloamidowy, 4-chlorobutyloamidowy, 3-bromoakryloamidowy i chlorambucylu. Doktorant podał dokładne przepisy wykonania poszczególnych syntez, wydajności z jakimi otrzymywał produkty, dla każdego związku podał wartości współczynnika R_f w analizie TLC i zinterpretował widma 1H NMR i ^{13}C potwierdzające strukturę. Wykonane syntezy doprowadziły do otrzymania zaplanowanych i oczekiwanych produktów. Są to nowe dotychczas nieopisane związki chemiczne.

W tym miejscu nasuwa się pytanie czy Doktorant próbował zmieniać parametry syntez aby otrzymywać związki z wyższą wydajnością? Czy wykonał, dla porównania, syntezę chociaż jednego związku klasyczną metodą laboratoryjną?

Część eksperymentalna zawiera również opis badań biologicznych. Autor w sposób jasny i zrozumiały opisał wyniki tych badań, dodatkowo prezentując je w 4 tabelach i na 14 wykresach.

Na podstawie stopnia wygaszania fluorescencji, wykazał, że niektóre spośród zsyntetyzowanych związków wiążą się silniej z DNA (plazmid pBR322) niż netropsyna. Najaktywniejsze pochodne to te, zawierające w strukturze dwa pierścienie benzenowe i fragment chlorambucylu oraz analogi bis-netropsyny z pentametylenowym łańcuchem.

Porównując wartości IC_{50} Doktorant wyselekcjonował najbardziej aktywną wobec komórek raka sutka MCF-7 pochodną netropsyny z dwoma pierścieniami benzenowymi i terminalnym fragmentem chlorambucylu. Najmniej aktywne okazały się pochodne bis-netropsyny z tetrametylenowym łańcuchem.

Wobec estrogenoniezależnych komórek nowotworowych MDA-MB-231 wszystkie zsyntetyzowane związki były bardziej aktywne od netropsyny, w tym najskuteczniejsze okazały się związki zawierające terminalny fragment 3-bromoakryloamidowy, a najsłabiej działały pochodne bis-netropsyny z pentametylenowym łańcuchem.

Niestety, zsyntetyzowane analogi netropsyny i bis-netropsyny hamowały również proliferację zdrowych komórek gruczołu piersiowego MCF-10A.

Wszystkie badane związki wraz ze wzrostem stężenia działały silniej zarówno na nowotworowe jak i zdrowe komórki.

Zsyntetyzowane związki, o założonej *a priori* strukturze, spełniły oczekiwania Doktoranta. Jednak ich aktywność biologiczna jest niezadowalająca aby mogły znaleźć zastosowanie w farmakoterapii. Uzyskane wyniki niewątpliwie wzbogacają dotychczasową wiedzę o aktywności biologicznej nowych analogów netropsyny. Słusznie stwierdza Autor, że efekty wykonanych przez niego badań mogą pomóc w projektowaniu nowych struktur o skutecznym działaniu przeciwnowotworowym.

Szkoda, że Autor nie zbadał innych właściwości biologicznych otrzymanych nowych związków np. właściwości mikrobiologicznych.

Obszerłą część pracy stanowi rozdział „Wyniki i dyskusja”. Autor opisując wyniki badań, uzupełnia je wyczerpującą dyskusją. Szuka przyczyn zbyt niskich wydajności reakcji. Porównuje struktury zsyntetyzowanych analogów, wskazuje różnice i wspólne elementy również z netropsyną, podejmuje próbę uzasadnienia różnic w aktywności biologicznej. Wskazuje struktury najbardziej aktywne. Sugeruje dalsze badania np. wyjaśniające sposób wiązania związków z DNA. Uzasadnia celowość poszukiwania analogów netropsyny. Przedstawione w dyskusji rozważania, wskazują na rzetelną i dokładną znajomość badanej tematyki.

Pracę kończy 10 wniosków, które wieńczą badania.

Należy docenić współpracę Doktoranta z innymi Ośrodkami i Zespołami Naukowymi, z Samodzielną Pracownią Analizy Leków, z Zakładem Diagnostyki Hematologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z Politechniką Białostocką i Łódzką.

Podsumowując stwierdzam, że synteza 24 nowych związków chemicznych, zbadanie ich aktywności biologicznej i głęboka analiza uzyskanych wyników świadczą o wartość poznawczej rozprawy doktorskiej.

Na zakończenie pragnę podkreślić przejrzysty sposób przedstawiania schematów przeprowadzanych syntez.

Praca napisana jest poprawnie, ale korekta nie jest staranna. Wykaz błędów, które zaznaczyłam w pracy przekazałam Autorowi. Bardzo licznie występują tzw. „literówki”. Niekiedy niefortunnie użyte są sformułowania. Korekty wymagają liczne pozycje w rozdziale „Piśmiennictwo”. Niektóre nazwy związków chemicznych budzą wątpliwości. Uchybienia, które spotkałam w redakcji pracy to też potoczne zwroty, żargonowe określenia. Łatwiej byłoby śledzić pracę gdyby Autor umieścił spis używanych skrótów i symboli.

Wymienione uwagi w porównaniu z zaletami pracy mają marginalne znaczenie, nie przesłaniają wartości badań wykonanych przez Doktoranta i ujętych w rozprawie.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji praca magistra Jakuba Szerszenowicza „Synteza na podłożu stałym i ocena aktywności przeciwnowotworowej analogów netropsyny i bis-netropsyny” wnosi elementy nowości, co w tej pracy szczególnie wysoko cenię, charakteryzuje się wysoką wartością merytoryczną wykonanych badań, spełnia kryteria prawidłowo zaplanowanej, zrealizowanej i udokumentowanej rozprawy doktorskiej.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie magistra Jakuba Szerszenowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, 29. 05. 2015

dr hab. inż. Julia Gibka