
POLSKA AKADEMIA NAUK
CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I
MAKROMOLEKULARNYCH
W ŁODZI
PRACOWNIA MAGNETYCZNEGO REZONANSU
JĄDROWEGO
90-363 ŁÓDŹ; UL. SIENKIEWICZA 112
TEL (0-42) 6803240
FAX (0-42) 684-71-26
E-MAIL; MAREKPOT@cbmm.lodz.pl



Laboratory equipped with BRUKER® spectrometers

POLISH ACADEMY OF SCIENCES
CENTRE of MOLECULAR and
MACROMOLECULAR STUDIES
NMR LABORATORY
90-363 ŁÓDŹ;
SIENKIEWICZA 112 POLAND
TEL (0-42) 6803240
FAX (0-42) 684-71-26
E-MAIL; MAREKPOT@cbmm.lodz.pl

29 grudnia, 2015.

Prof. dr hab. Marek J. Potrzebowski

Opinia na temat pracy doktorskiej mgr Beaty Naumczuk pt;

**“Synteza i badanie właściwości chemicznych i biologicznych
potencjalnych inhibitorów topoizomerazy I oddziałujących z
oligomerami DNA”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Lecha Kozerskiego.

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Beaty Naumczuk ulokowana jest w ważnym nurcie badań podstawowych związanych z poszukiwaniem nowych leków przeciwnowotworowych i/lub modyfikacją ich form użytkowych. Wpisuje się bardzo silnie w tematykę badawczą od wielu lat, z powodzeniem realizowaną w zespole Prof. Lecha Kozerskiego.

Praca doktorska mgr Naumczuk ma tradycyjny układ i składa się z trzech elementów stanowiących spójną całość; przeglądu literatury, badań własnych oraz części eksperymentalnej. We wstępnym fragmencie części literaturowej Doktorantka opisuje mechanizmy oddziaływania leków z DNA zwracając szczególną uwagę na niespecyficzne wiązanie na zewnątrz nici DNA, interkalacje, oddziaływania w małej i dużej bruzdzie, alkilowanie DNA oraz konsekwencje terapeutyczne wynikające z przerwania nici DNA. W dalszej części przeglądu literatury mgr Naumczuk omawia szczegółowo mechanizmy działania wybranych leków przeciwnowotworowych takich jak mechloretamina, mitomycyna C, cisplatyna czy bleomycyna. Szczególną pozycję wśród omawianych

terapeutyków zajmują inhibitory topoizomerazy I takie jak topotekan czy irinotekan, których analogi są obiektami badań i wnikliwej analizy opisanymi w drugiej części dysertacji (Badania Własne).

Część literaturowa pokazuje złożoność całego procesu terapeutycznego w leczeniu chorób nowotworowych uzmysławiając jednocześnie, że nie ma idealnego leku, który spełniałby oczekiwania pacjentów i lekarzy. Wszystkie współcześnie stosowane farmaceutyki są albo zbyt toksyczne w stosunku do tkanek zdrowych albo wykazują zbyt małą selektywność lub wywołują cały szereg niepożądanych efektów ubocznych. Ograniczenia te wydają się wystarczającą motywacją aby uznać za celowe wysiłki doktorantki zmierzające do otrzymania takich modyfikacji leków przeciw-nowotworowych, które zwiększyłyby skuteczność terapeutyczną.

Zagadnieniom tym poświęcona jest zasadniczą część dysertacji, w której mgr Naumczuk opisuje sposoby chemicznej modyfikacji pochodnych topotekanu i kamptotecyny. Celem tych działań jest poprawienie rozpuszczalności w środowisku wodnym związków stosowanych w terapiach nowotworowych gdyż słaba rozpuszczalność jest jednym z czynników limitujących ich praktyczne wykorzystanie. Prace syntetyczne prowadzone były dwutorowo. Pierwszym celem była synteza i wyizolowanie w formie czystej czwartorzędowej soli topotekanu, drugim było opracowanie metody syntezy nowych pochodnych kamptotecyn zawierających podstawniki aminowe połączone z rdzeniem głównym poprzez grupę metylenową. Kolejnym etapem były badania fizykochemiczne mające na celu określenie trwałości otrzymanych produktów w różnych rozpuszczalnikach i wyznaczenie okresu półtrwania w wodzie. Intrygującym problemem i wyzwaniem intelektualnym, które podjęła Doktorantka była próba zrozumienia mechanizmu i regioselektywności oddziaływania nowych pochodnych kamptotecyn z DNA. W tym celu zostały skonstruowane odpowiednie układy referencyjne zbudowane z modelowych nukleozydów. Finalnym elementem zaplanowanych badań były testy biologiczne *in vitro* na komórkach nowotworowych, których celem było określenie aktywności terapeutycznych otrzymanych związków.

Po uważnym przeczytaniu rozprawy i zapoznaniu się z całością materiału mogę stwierdzić, że od strony warsztatowej praca nie budzi zastrzeżeń. Podstawowe cele badawcze sformułowane przez Doktorantkę zostały osiągnięte i przekonywująco uzasadnione. Prowadząc badania fizykochemiczne mgr Naumczuk wykorzystywała w dużym stopniu metodologię dobrze rozpoznane i sprawdzone w laboratorium prof. L. Kozerskiego w czasie realizacji wcześniejszych projektów.

Mimo pozytywnej oceny i pełnej akceptacji co do meritum oraz zawartości rozprawy odczuwam pewien niedosyt, gdyż pewne wątki, które wydają się dosyć istotne nie są wystarczająco przeanalizowane lub pogłębione.

1) Niewyjaśniony problem mechanizmu oddziaływania pochodnych kampotecyn z DNA. Mgr Naumczuk rozważa dwie alternatywne drogi alkilowania DNA, poprzez produkt pośredni o-metylenochinon (QM) lub w wyniku substytucji nukleofilowej. Badając pochodną SN38 stwierdza jedynie, że reakcja jest nieselektywna. Zdaję sobie sprawę, że rozstrzygnięcie, który z mechanizmów jest dominujący (być może oba są równouprawnione) na drodze eksperymentalnej nie jest łatwe. Niewykluczone, że podstawienie grupy hydroksylowej w pozycji 10 eliminujące możliwość tautomerii i tworzenie produktu pośredniego QM mogłoby być nie tylko ciekawym wyzwaniem intelektualnym ale i źródłem kluczowych informacji. Z drugiej strony, obawa że taka modyfikacja chemiczna w istotny sposób wpłynęłoby na właściwości biologiczne badanych związków jest w pełni uzasadniona. Alternatywnym podejściem mogłoby być wykorzystanie metod obliczeniowych i określenie energii stanów przejściowych i produktów pośrednich. Wydaje się to możliwe, szczególnie w przypadku modelowych układów takich jak 2'-deoksyguanozyna w reakcji z SN38 czy BN37.

2) Problem dynamiki molekularnej. Doktorantka sygnalizuje ten problem w odniesieniu do pochodnych kampotecyn stwierdzając że cykliczne aminy znajdujące się w łańcuchach bocznych modyfikacji BN67A, BN49A, BN71A, BN37A i BN74A mogą podlegać złożonym ruchom molekularnym w fazie ciekłej. Procesy te mogą mieć zróżnicowany charakter, może to być inwersja pierścienia lub rotacja wokół wiązania C24-N. Procesy te nie muszą się wykluczać i mogą mieć bardzo zindywidualizowany charakter w zależności od charakteru podstawnika. Z wysokim prawdopodobieństwem można założyć, że inna będzie dynamika pierścienia morfolinowego, piperydynowego czy piroolidynowego. Zapewne w zależności od wielkości pierścienia (cztero-, pięcio lub sześciocłonowe) różna będzie bariera rotacji wokół wiązania C-N. Być może warto byłoby zadać pytanie, czy procesy dynamiczne w jakikolwiek sposób skorelowane są z farmakokinetyką, o której wspomina mgr Naumczuk w rozdziale 7.2? Czy mają wpływ na stabilność, czas półtrwania i inne parametry fizykochemiczne.

3) Badania temperaturowe. Analizując oddziaływania pochodnych kampotecyn (SN38) z modelowym oktamerem DNA $d(\text{GCGATCGC})_2$ Doktorantka ogranicza się do pomiarów NMR w dwóch temperaturach, pokojowej (co nie jest definicją jednoznaczną) i w temperaturze 10 °C (podrozdział 7.3.1). W wyniku oddziaływania ligandów z DNA

obserwuje poszerzenie sygnałów protonowych na widmach NMR, co w odczuciu autorki może być konsekwencją „pośredniej” szybkości wymiany pomiędzy formą związaną a wolnym DNA. Nie bardzo wiem co kryje się za pojęciem „pośrednia” i w tym miejscu komentarz byłby wskazany. Brakuje mi również precyzyjnej informacji o wartościach stałej szybkości wymiany pomiędzy ligandem a DNA. Ten element byłby szczególnie istotny gdyby mgr Naumczuk uznała za celowe zbadanie oddziaływań ligand-DNA w warunkach fizjologicznych czyli w temp. 36 °C. Domyślam się że brak tego typu badań wynika z przekonania, że w temp. 36 °C proces wymiany w skali czasu NMR jest na tyle szybki, że nie da się zaobserwować oddziaływań ligand-DNA. Prosta analiza widm ^1H i porównanie zmian przesunięć chemicznych dla oktameru i kompleksu ligand/oktamer byłoby dobrym testem rozwiewającym wątpliwości. Sugerowałbym również poszerzenie zestawu technik 2D NMR o eksperyment ROESY, który mógłby wnieść dodatkowe informacje na temat oddziaływań ligand DNA, szczególnie podczas pomiarów w podwyższonych temperaturach.

Uwagi, które mają charakter polemiczny nie wpływają na pozytywną opinię na temat dysertacji, mgr Beaty Naumczuk. Przedstawiony materiał faktograficzny jest obszerny i dobrze udokumentowany. Doktorat jest bardzo dobrze skonstruowany i sformułowany. Szata graficzna jest mocną stroną przedstawionej dysertacji.

Uważam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszelkie wymogi merytoryczne i formalne stawiane tego typu opracowaniom w Ustawie o stopniach i tytule naukowym z 14 marca 2003 r. (Dz. U. nr 65, poz 595). Uwzględniając powyższe fakty, z całym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Beatę Naumczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

