

Prof. dr hab. Krzysztof Rolka
KIEROWNIK KATEDRY CHEMII BIOORGANICZNEJ

ul. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
tel. +48-58-523 5386
fax +48-58-523 5472
e-mail: krzys@chem.univ.gda.pl

Ocena pracy doktorskiej mgr Agnieszki M. Głowińskiej
p.t. „Synthesis of opioid-peptide platinum(II) complexes with potential antiproliferative activity”

Cisplatyna (*cis*-diamminodichloroplatyna(II)) była pierwszym związkiem koordynacyjnym platyny, który w latach 70. ubiegłego wieku został dopuszczony jako preparat w terapii przeciwnowotworowej. Stosuje się ją głównie w wypadku raka płuc, jąder oraz pęcherza moczowego. Działanie cisplatyny związane jest z jej aktywnością cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych i polega na sieciowaniu znajdujących się blisko siebie nici DNA, co prowadzi do zahamowania replikacji DNA komórek nowotworowych, a w konsekwencji uniemożliwia podział komórek. Niestety, oprócz pożądanego działania terapeutycznego, cisplatyna charakteryzuje się też działaniem toksycznym i obserwowanym zjawiskiem oporności, co w połączeniu z niską przyswajalnością znacznie ogranicza jej wykorzystanie w praktyce medycznej. Badania nad cisplatyną doprowadziły do opracowania drugiej i trzeciej generacji jej analogów, charakteryzujących się korzystniejszym profilem farmakologicznym. Niemniej, w dalszym ciągu nie są one pozbawione wad macierzystego związku. Tym samym prace nakierowane na opracowanie nowych cytostatyków – pochodnych cisplatyny, są ze wszelkich miar uzasadnione. Zadania tego podjęła się w ramach pracy doktorskiej mgr Agnieszka Głowińska. W kontekście zarysowanej powyżej problematyki temat recenzowanej rozprawy bez wątpienia zaliczyć można do głównego nurtu współczesnej chemii medycznej, a realizowane zadania badawcze uważam za oryginalne.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska należy do obszernych i liczy 277 stron tekstu. Praca napisana została w języku angielskim. Zapewne wiązało się to z dodatkowym

wysiłkiem ze strony Kandydatki. Dzięki temu jednak rozprawa może funkcjonować w obiegu międzynarodowym, tym samym zwiększa szanse zawodową rozpoznawalność Kandydatki. Z obowiązku recenzenta dodam tylko, iż Ustawa stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Art. 13 p. 6) nakłada obowiązek zamieszczania w rozprawie streszczenia w języku polskim. Jego brak to uchybienie formalne, nie ma wpływu na ocenę merytoryczną rozprawy. Poza tym, układ pracy jest typowy dla tego typu opracowań. Zasadnicze rozdziały pracy to: Introduction (69 stron), General objectives (10 stron), Results and discussion (50 stron), Experimental part (120 stron). Spis literatury cytowanej liczy 167 pozycji, odwołujących się do prac opublikowanych w ostatnich dwóch dekadach. Dyskusja otrzymanych wyników i opis prowadzonych eksperymentów to zasadnicza część opracowania, co już na wstępie sugeruje znaczną objętość pracy eksperymentalnej wykonanej przez Kandydatkę.

Pierwsza część dysertacji bardzo dobrze wprowadza w problematykę badań własnych Kandydatki. Poświęcona jest głównie zagadnieniom związanym z charakterystyką kompleksów cisplatyny z DNA, białkami i peptydami w kontekście jej aktywności biologicznej. Kompleksy koordynacyjne, jakie tworzy ten metalofarmaceutyk z DNA powstają najczęściej w wyniku połączeń krzyżowych pomiędzy cząsteczką cisplatyny a atomami azotu (N7) sąsiadujących reszt guaniny lub guaniny i adeniny, zarówno w obrębie jednej jak i obu nici dwupłatu DNA. Te ostatnie odpowiedzialne są za efekt cytotoksyczny. Znajduje się tutaj także interesująca dyskusja czynników ograniczających terapeutyczne zastosowanie cisplatyny i jej pochodnych. Do najważniejszych należą ich niska rozpuszczalność, konieczność stosowania iniekcji (dożylnych lub dootrzewnych) oraz niespecyficzne wiązanie się z biomolekułami (białkami i peptydami) poprzez atomy siarki lub azotu. Te ostatnie są przyczyną bardzo dużej toksyczności związków platyny(II). Autorka szczegółowo dyskutuje też kilka przykładów reakcji cisplatyny z peptydami, których przebieg w znacznym stopniu zależy od warunków ich prowadzenia, co dodatkowo komplikuje i tak trudne do przewidzenia efekty biologiczne tych związków. Do badań własnych Kandydatki nawiązują też rozdziały, w których omawia kolejno: wykorzystanie poli(tlenku etylenu) i jego pochodnych do poprawy właściwości farmakokinetycznych związków biologicznie czynnych, wykorzystanie peptydów opioidowych, jako nośników umożliwiających specyficzny transport terapeutyka do komórek nowotworowych, a także metody syntezy kompleksów platyny(II). Poziom merytoryczny tej części pracy jest wysoki, Kandydatka przekonuje, że potrafi redagować tekst naukowy w języku angielskim. Moje uwagi do tej części rozprawy odnoszą się do strony redakcyjnej. Rysunki 10 i 11 są identyczne. Dla niektórych z rysunków (np. 19, 21, 24, 40, także w innych rozdziałach) zamieszczonych w rozprawie nie ma odwołań w

tekście lub jest niewłaściwy (np. rys. 24 na str. 40). Brak jest konsekwencji w stawianiu kropki przed lub po odnośniku literaturowym. Dwa pierwsze wzory chemiczne w tablicy 4 nie odpowiadają podpisom. W kilku miejscach Doktorantka prezentując wyniki podaje powołuje się na najprawdopodobniej liderów grup (np. Sheldrick (str. 27), Bantley *et al.* (str. 30)) niestety, nazwisk tych nie ma w odnośnikach literaturowych. Na marginesie format literatury cytowanej wymaga ujednolicenia. Zdanie 3 na str. 46 zdaje się być niedokończone. W wypadku stosowania skrótów trójliterowych aminokwasów pisanych z dużej litery nie ma potrzeby podawania konfiguracji względnej (Met-Leu – str. 51). Określenie „library of derivatives” (str. 61 oraz podpis pod rysunkiem 34), może sugerować, iż związki te otrzymane były metodami chemii kombinatorycznej. W rzeczywistości to tylko kilka związków. Proponowałbym zastąpić słowo „library,” innym sformułowaniem np. „set, series”. Przedstawione powyżej niedociągnięcia nie utrudniają lektury tekstu rozprawy. Mam nadzieję, że okażą się pomocne Kandydatce podczas redakcji kolejnych tekstów naukowych.

Celem rozprawy była próba otrzymania peptydowych pochodnych cisplatyny, które charakteryzowałyby się właściwościami terapeutycznymi lepszymi niż macierzysty związek. Mimo ogromnego zapotrzebowania na skuteczne cytostatyki, co bez wątpienia skutkowało uruchomieniem szeroko zakrojonych programów badawczych, bardzo niewiele pochodnych cisplatyny znalazło zastosowanie w praktyce medycznej. Uwzględniając ten fakt, cel postawiony przed Kandydatką był bardzo ambitny. Pomysłem na podniesienie selektywności cytotoksyczności kompleksów platyny(II) w odniesieniu do komórek nowotworowych, jaki zastosowała Doktorantka, było wykorzystanie jako wektorów peptydów opioidowych. Obserwowana nadekspresja receptorów opioidowych w tkankach nowotworowych powinna zwiększyć powinowactwo syntetyzowanych pochodnych do tkanek nowotworowych, a macierzysta aktywność przeciwbólowa peptydów wzmocnić efekt terapeutyczny kompleksów. Jony platyny(II) tworzące kompleksy na C-końcach peptydów opioidowych (enkefaliny(1-4), endomorfiny, TAPP i bifaliny) pełniły rolę ugrupowań toksoforowych. Reszty Cys, His, Met, Asp, Glu, Ser, Thr, Dap i Dab przyłączone poprzez grupy aminowe lub karboksylowe na C-końcach wektorów peptydowych zapewniały odpowiednie miejsca koordynacyjne (poprzez atomy azotu, tlenu lub siarki) jonom platyny(II). W wypadku niektórych związków, zwiększenie odległości toksoforu od farmakoforu polegało na zastosowaniu odpowiedniego łącznika pomiędzy ugrupowaniami. Wysoko oceniam zarówno sam pomysł wykorzystania peptydów opioidowych, jako wektorów ułatwiających transport jonów platyny do komórek nowotworowych, jak też inwencję w projektowaniu struktur pierwszorzędowych peptydów, umożliwiających różne sposoby chelatowania jonów platyny(II).

Prezentacja uzyskanych wyników i ich dyskusja zawarta jest w kolejnej części rozprawy. Zadania badawcze realizowane przez Kandydatkę obejmowały syntezę 41 kompleksów platyny(II) z peptydami. Syntezy peptydów realizowane były klasyczną metodą w roztworze lub na nośniku stałym. Na podkreślenie zasługuje objętość pracy wykonanej przez Doktorantkę. Dzięki wieloletniej współpracy promotorki rozprawy prof. Aleksandry Misickiej z prof. Andrzejem Lipkowskim z Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, związki chemiczne syntetyzowane przez mgr Głowińską zostały poddane badaniom biologicznym. Dla wybranych kompleksów przeprowadzono ocenę ich powinowactwa do receptorów opioidowych oraz cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych (komórki linii glejaka ludzkiego T98G). Zapewnienie badań biologicznych, umożliwiających weryfikację hipotez badawczych, to kolejny mocna strona recenzowanej rozprawy. Niestety, mimo zdawałoby się znacznego oddalenia toksoforu od farmakoforu, większość kompleksów platyny(II) utworzonych na C-końcach peptydów wykazywały znacznie obniżają powinowactwo do receptorów opioidowych niż macierzyste peptydy. Niemniej kilka z kompleksów (4.3.2.3, 4.4.1.7 i 4.5.1.3) charakteryzowały się nie tylko wysokim powinowactwem, ale też większą specyficznością receptorową niż macierzyste peptydy. Spośród badanych peptydowych kompleksów platyny(II), jeden (4.4.1.1), będący analogiem bifaliny z resztą Cys na C-końcu przejawiał cytotoksyczność zbliżoną do cisplatyny. Nadto, wykazując umiarkowane powinowactwo do receptorów opioidowych, wiązał się preferencyjnie do receptora μ . Związek ten z pewnością zostanie poddany pogłębionym badaniom biologicznym. Jednym z celów badań Kandydatki było otrzymanie kompleksów platyny(II) o większej rozpuszczalności niż cisplatyna. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, iż rozpuszczalność niektórych przebadanych związków była kilkakrotnie wyższa. Podsumowując wyniki badań eksperymentalnych rozprawy stwierdzić można, że spośród serii peptydowych kompleksów platyny(II), jeden związek charakteryzował się pożądanymi właściwościami biologicznymi. Biorąc pod uwagę jak niewiele analogów cisplatyny znalazło zastosowanie w praktyce medycznej, wynik ten należy uznać, za co najmniej zadowalający. Uważam, że Kandydatka zrealizowała cele, jakie przed nią postawiono. Do tej części pracy mam też tylko kilka uwag krytycznych. Numeracja związków jest zbyt skomplikowana (składa się z czterech cyfr). Utrudnia to lekturę tekstu. W wypadku związków zawierających C-końcową resztę Glu, lub Asp zapis $\text{Glu}(\text{OH})_2$ ($\text{Asp}(\text{OH})_2$) sugeruje, że w łańcuchu bocznym aminokwasu znajdują się dwie grupy hydroksylowe, co oczywiście nie ma miejsca. Na str. 115 i 117 dla związku 4.5.1.3 podane są inne wartości IC_{50} . Na str. 124 i 125 Kandydatka podaje, że badane związki stymulują