



# POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA

Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska

Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok, tel. 609 115 298,

e-mail: w-lewando@wp.pl

Białystok, 13.07.2018

Prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski  
Politechnika Białostocka  
Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

## *Ocena rozprawy doktorskiej*

*mgr farm. Krzysztofa Kubicy pt. „Nowe pochodne chinoliny oraz 2,6-diketopiperazyny jako potencjalne związki biologicznie czynne”  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Aleksandra P. Mazurka*

Mimo olbrzymich nakładów na badania oraz leczenie, zachorowalność i umieralność na nowotwory jest ciągle bardzo duża. Do najważniejszych problemów terapii przeciwnowotworowej zalicza się toksyczność stosowanych leków w stosunku do komórek zdrowych oraz lekooporność wielolekową na chemioterapeutyk. Ponadto brak selektywności dotychczas stosowanych leków przeciwnowotworowych w stosunku do komórek nowotworowych oraz szereg niepożądanych efektów ich działania skłania do poszukiwania skutecznych terapeutycznie i mniej toksycznych ich analogów.

Hamowanie aktywności kinaz białkowych jest jednym z ważnych elementów ukierunkowanych terapii przeciwnowotworowych. Mgr Krzysztof Kubica zsyntezował nowe pochodne chinoliny, które należą do inhibitorów kinaz białkowych oraz antagonistów kwasu foliowego. W sumie 36 różnych strukturalnie związków, których aktywność biologiczna została oceniona na podstawie testów żywotności na trzech liniach komórek nowotworowych (mysi czerniak B16F10, ludzki rak szyjki macicy HeLa i ludzka białaczka HL-60) oraz jednej linii komórek prawidłowych, tj. mysich fibroblastach NIH3T3. W celu ustalenia wpływu



wszystkich związków na linii mysiego czerniaka. Wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports:

- 1) K. Kubica, P. Taciak, A. Czajkowska, A. Sztokfisz-Ignasiak, R. Wyrębiak, P. Podsadni, I. Młynarczuk-Biały, J. Malejczyk, A. Mazurek, „*Synthesis and anticancer activity evaluation of some new derivatives of 2-(4-benzoyl-1-piperazinyl)-quinoline and 2-(4-cinnamoyl-1-piperazinyl)-quinoline*”, Acta Polonia Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 75, No. 4, 2018. IF = 0.876
- 2) K. Kubica, P. Taciak, A. Czajkowska, A. Sztokfisz-Ignasiak, R. Wyrębiak, I. Młynarczuk-Biały, J. Malejczyk, A. Mazurek, „*Synthesis and anticancer activity evaluation of novel derivatives of 7-amino-4-methylquinolin-2(1H)-one*”, Acta Polonia Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 75, No. 4, 2018. IF = 0.876

W publikacji nr 1 przedstawiono metodykę syntezy 20 nowych pochodnych 2-(1-piperazynylo)-choliny. Strukturę związków potwierdzono za pomocą spektroskopii rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR), cienkowarstwowej chromatografii cieczowej (TLC) oraz spektroskopii masowej (LC MS). Uzyskane wyniki badań wykazały, że zsyntezowane związki posiadają aktywność przeciwnowotworową zależną od typu nowotworu. Linia mysiego czerniaka była najbardziej wrażliwa na działanie badanych związków, natomiast komórki ludzkiej białaczki są najbardziej na nie odporne. Co ważne otrzymane związki wykazywały niewielką toksyczność w stosunku do linii komórek prawidłowych. Dużym sukcesem jest to, że siedem z badanych związków, które wykazywały najwyższą zdolność hamowania wzrostu komórkowego, zakwalifikowano do dalszych badań. Trzy spośród nich silnie hamowały wzrost komórek mysiego czerniaka.

W publikacji nr 2 zsyntezowano 16 nowych pochodnych 7-amino-4-metylocholin-2(1H)-onu. Wśród zsyntezowanych związków są (a) inhibitory kinaz białkowych, (b) antagoniści kwasu foliowego, (3) grupa wykazująca analogię do estrów kwasu galusowego i hydroksylowych pochodnych kumaryny. Doktorant wykazał się dużą znajomością technik syntezy organicznej oraz wiedzą nt. strategii projektowania leków przeciwnowotworowych. Struktury związków potwierdzono na podstawie TLC oraz widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Badania aktywności biologicznej przeprowadzono w analogiczny sposób jak w publikacji nr 1. Część z badanych związków wykazała się selektywnością w stosunku do komórek nowotworowych. Ponadto zsyntezowane związki wykazywały różną aktywność w stosunku do poszczególnych



komórek nowotworowych. Komórki czerniaka myszy były odporne, natomiast komórki białaczki i raka szyjki macicy były wrażliwe na niektóre z testowanych związków. Trzy z badanych związków wykazały zdolność hamowania migracji komórek HeLa.

Podsumowując należy stwierdzić, że mgr Krzysztof Kubica wykonał syntezę dużej grupy związków (w sumie 36) oraz zbadał ich aktywność cytotoksyczną/cytostatyczną w teście żywotności (wykonując barwienie komórek fioletem krystalicznym). Kilka z otrzymanych związków wykazało obiecujące właściwości przeciwnowotworowe i będą w przyszłości dalej badane. Zastosowany w pracy test oceniający aktywność biologiczną związków chemicznych jest podstawowym narzędziem w testach przesiewowych, dlatego zdecydowanie zabrakło bardziej wnikliwej analizy mechanizmu działania tych najbardziej aktywnych biologicznie związków.

Kolejnym etapem badań było zsyntezowanie 16 nowych pochodnych 2,6-diketopiperazyny, która charakteryzuje się działaniem przeciwdrgawkowym. Struktury związków ustalono na podstawie widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, widm w podczerwieni, spektroskopii masowej oraz skręcalności optycznej. Aktywność przeciwdrgawkową określono stosując test maksymalnego elektrowstrząsu, test podskórny metrazolu oraz test 6 Hz (w którym drgawki są wywołane bodźcem elektrycznym). Oceniono również neurotoksyczność związków w teście Rotaroda. Wyniki badań przedstawiono w publikacji:

- 3) M. Dawidowski, M. Wilczek, K. Kubica, M. Skolmowski, J. Turło, „*Structure-activity relationships of the aromatic site in novel anticonvulsant pyrrolo[1,2-a]pyrazine derivatives*”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 23, Issue: 22, (2013) Pages: 6106-6110. IF = 2.286

Zaprezentowane wyniki badań wskazują, że pochodne z meta-podstawionym ugrupowaniem fenylowym charakteryzują się najsilniejszą aktywnością przeciwdrgawkową. Ponieważ pochodne z innym podstawnikiem niż fenyłowy nie były aktywne, sugeruje to, że obecność ugrupowania fenyłowego jest kluczowym elementem budowy potencjalnych związków o aktywności przeciwdrgawkowej.

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorant osiągnął planowany cel badań polegający na:



- (a) syntezie i ocenie aktywności przeciwnowotworowej nowych pochodnych chinoliny oraz
- (b) syntezie i badaniu działania przeciwdrgawkowego nowych pochodnych 2,6-diketopiperazyny.

Uważam, że dobór technik badawczych nie budzi zastrzeżeń, chociaż zastosowanie innych dodatkowych metod, które pozwoliłyby na głębszą dyskusję mechanizmu działania przeciwnowotworowego zsyntezowanych związków, byłoby bardzo cenne. Badania przeprowadzono dla dużej liczby pochodnych chinoliny i 2,6-diketopiperazyny, co pozwoliło z sukcesem wytypować bardzo obiecującą grupę związków do przyszłych badań. Doktorant wykazał się znajomością syntezy i chemii organicznej oraz przeprowadził badania aktywności biologicznej otrzymanych związków, co stanowi ważny praktyczny aspekt rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr K. Kubicy opiera się na 4 publikacjach o sumarycznym IF=4,04. Pierwsza publikacja jest pracą przeglądową dotyczącą wemurafenibu, który nie wykazuje znaczącego strukturalnego podobieństwa do badanych w ramach rozprawy doktorskiej związków chemicznych. Jednak publikacja stanowi pewne źródło wiedzy na temat problemów terapii przeciwnowotworowej oraz zastosowania inhibitorów kinaz białkowych jako leków przeciwnowotworowych w leczeniu czerniaka. I to właśnie linie komórkowe mysiego czerniaka oraz związki będące potencjalnymi inhibitorami kinaz białkowych były tematem rozprawy doktorskiej. Praca przeglądowa została wydana w Biuletynie Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Kolejne trzy publikacje zostały opublikowane w czasopiśmie znajdującym się w bazie Journal Citation Reports i dotyczą badań będących celem rozprawy doktorskiej. Ponieważ w pracach tych lista współautorów jest znacząca (od 5 do 9 osób) powstaje pytanie o ich udział w powstaniu publikacji, które są podstawą rozprawy doktorskiej. Do każdej publikacji powinny być dołączone informacje dotyczące charakteru udziału poszczególnych osób w badaniach. W trzech publikacjach mgr Krzysztof Kubica jest pierwszym współautorem. Natomiast w ostatniej publikacji figuruje on na trzecim miejscu wśród autorów pracy, co sugeruje jego znacznie mniejszy udział w powstaniu publikacji w porównaniu do pierwszego i drugiego autora.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Kubicy jest bardzo wartościowa i stanowi doskonały wstęp do dalszych badań nad nowymi związkami przeciwnowotworowymi oraz przeciwdrgawkowymi. Cel rozprawy został osiągnięty.



W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Krzysztofa Kubicy jest bardzo wartościowa i stanowi doskonały wstęp do dalszych badań nad nowymi związkami przeciwnowotworowymi oraz przeciwdrgawkowymi. Cel rozprawy został osiągnięty. Udokumentowany dorobek naukowy oraz współautorstwo w zgłoszeniach patentowych na tym etapie kariery z pewnością prognozuje dalszy rozwój naukowy. Doktorant posiada zasób wiedzy teoretycznej i umiejętność wykorzystania technik doświadczalnych, co w pełni uzasadnia samodzielne prowadzenie przez niego prac naukowych w przyszłości.

**Zdaniem recenzenta praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), a także w Rozporządzeniu Ministra Edukacji Narodowej i Sportu z dn. 15 stycznia 2004 r. (Dz. U. 15 poz. 128) z późniejszymi zmianami. Wnoszę zatem, aby Wysoka Rada Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej dopuściła mgr Krzysztofa Kubicę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Prof. Włodzimierz Lewandowski

