

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Martyny Korcz pt. „*Synteza i badania biologiczne in vitro nowych pochodnych chinoliny o potencjalnym działaniu chemioterapeutycznym*”, wykonanej w Katedrze i Zakładzie Technologii Chemicznej Środków Leczniczych Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym.

Rozwój przemysłu, degradacja środowiska oraz specyficzny tryb życia mieszkańców wielkich aglomeracji doprowadził do pojawienia się nowego zjawiska, jakim są choroby cywilizacyjne. Z pośród nich bardzo ważne miejsce zajmują choroby nowotworowe. Mimo rozwoju medycyny, zachorowalność na nowotwory cały czas rośnie – w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat doszło do podwojenia ilości zachorowań. Nowotwory są drugą najczęstszą przyczyną zgonów w Polsce, zaraz po chorobach układu krążenia. Warto jednak zauważyć, że diagnoza choroby nowotworowej nie zawsze oznacza brak szans na wyzdrowienie. Jak zauważa w części literaturowej doktorantka, Narodowy Instytut Raka w USA prezentuje na swoich stronach internetowych ponad 200 leków stosowanych w leczeniu chorób nowotworowych. Jednakże, należy zwrócić uwagę, że w dalszym ciągu wyniki leczenia nie są zadowalające co powoduje, iż nadal istnieje konieczność poszukiwania nowych substancji leczniczych, które umożliwiłyby opracowanie nowych strategii leczenia nowotworów.

Poszukiwania te mogą odbywać się na kilka sposobów. Podejście tradycyjne polega na przetestowaniu kilku tysięcy substancji z nadzieją, iż wśród nich trafi się na strukturę aktywną. W dzisiejszych czasach mówimy o racjonalnym projektowaniu leków. Bardzo często mamy wtedy na myśli zaplanowanie eksperymentów i w gruncie rzeczy, przeprowadzenie ich *in silico* począwszy od wyboru celu molekularnego, poprzez identyfikację struktury wiodącej do identyfikacji białek kluczowych. Podejście tradycyjne można porównać do błądzenia we mgle, ale to podejście doprowadziło do odkrycia większości stosowanych leków. Niektórzy twierdzą, że synteza to przeżytek, to strata czasu i pieniędzy, ale ile mamy leków "zaprojektowanych"?

Praca Pani Martyny Korcz jest przykładem na to, że synteza wciąż jeszcze ma sens. Doskonale też wpisuje się w aktualny nurt badawczy dotyczący poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwnowotworowej i przeciwdrobnoustrojowej o strukturach innych niż dotychczas stosowane leki.

Praca doktorska przedstawiona do recenzji jest opracowana w sposób klasyczny. Obejmuje opis celu i zakresu prac badawczych (7 stron), przegląd literaturowy (30 stron i 58 zacytowanych pozycji literaturowych w tej części pracy), badania własne (37 stron i 48 zacytowanych pozycji literaturowych), podsumowanie i wnioski (5 stron) oraz część eksperymentalną (36 stron). W części literaturowej autorka dokonuje klasyfikacji leków przeciwnowotworowych oraz przeglądu trzech klas związków heterocyklicznych tj. chinoliny, 1,2,4-triazolu i benzotriazolu pod kątem ich aktywności biologicznej obejmującej działanie chemioterapeutyczne: cytotoksyczne i przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciw pasożytnicze. Przegląd ten przedstawia szereg pochodnych wymienionych powyżej trzech klas związków heterocyklicznych, które zostały wprowadzone do leczenia jako leki. Ponadto ten rozdział wskazuje na dobre rozeznanie literaturowe doktorantki we współczesnych kierunkach poszukiwań nowych leków. Wiedzę tę wykorzystała autorka w badaniach własnych syntezując pochodne chinoliny podstawione 1,2,4-triazolem lub benzotriazolem, dla których została określona również aktywność przeciwnowotworowa względem 3 linii komórek nowotworowych.

Celem pracy było otrzymanie trzech serii nowych pochodnych chinoliny, a następnie określenie ich trwałości chemicznej i wykonanie testów biologicznych na liniach nowotworów ludzkich. Swoje badania doktorantka rozpoczęła od zbadania reakcji 2-chlorochinolino-3-karbaldehydu z kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowym (HOSA). Wbrew oczekiwaniom w tym procesie nie powstała odpowiednia hydroksyloaminowa pochodna wyjściowego aldehydu, która miała zostać użyta przez doktorantkę do syntezy związków serii A. Jedynym produktem tej przemiany była 2-chloro-3-cyjanochinolina, której mechanizm tworzenia został zaproponowany w sposób logiczny przez autorkę pracy. Podobnie bardzo przejrzyste został przedstawiony mechanizm powstawania estrów kwasu chinolino-3-karboksyłowego z podstawnikiem *O,N*-dialkilo hydroksyloaminowym w pozycji 2.

Kolejnym etapem badań była synteza chinolino-3-karbaldehydów podstawionych 1,2,4-triazolem lub benzotriazolem w pozycji 2. Tak otrzymane aldehydy zostały wykorzystane do syntezy nowych pochodnych chinoliny, które można zaliczyć do grupy określanej jako zasady Schiffa. W pierwszej kolejności zostały otrzymane hydrazony (**3a-e** i

4a-e), a następnie *N*-acylohydrazony (**5a-h** i **6a-h**) i sulfonylohydrazony (**7a-h** i **8a-h**). Hydrazony tworzyły się na drodze klasycznej reakcji aldehydów z pochodnymi hydrazyny, natomiast do syntezy *N*-acylohydrazonów wykorzystano odpowiednie hydrazydy kwasów organicznych, które reagowały z aldehydami w obecności katalitycznej ilości kwasu octowego. W bardziej drastycznych warunkach prowadzono reakcję z arylosulfonylohydrazydami, gdyż cechują się one niższą reaktywnością w stosunku do hydrazydów. Otrzymane przez doktorantkę chinolinowe aldehydy (**III** i **IV**) zostały także wykorzystane do syntezy semikarbazonów, tiosemikarbazonów oraz oksymów i ich eterów oraz imin (**11e** i **12e**). Syntezę *O*-alkilooksymów doktorantka realizowała stosując handlowe alkosyaminowe pochodne. W tym miejscu można zadać pytanie, czy nie lepszym rozwiązaniem jest reakcja alkilowania oksymów dająca możliwość wprowadzania różnorodnych grup alkilowych do funkcji oksymowej. W końcowym etapie syntezy podstawione chinolino-3-karbonylowe aldehydy doktorantka przekształciła w odpowiednie kwasy chinolino-3-karbonylowe stosując opisaną w literaturze metodę z nadtlaniem wodoru, chlorkiem sodu oraz diwodorofosforanem (V) sodu w mieszaninie wody i acetonitrylu. Interesująca z punktu chemicznego jest przemiana tych kwasów w estry metylowe z jednoczesną hydrolizą wiązania pomiędzy chinoliną a 1,2,4-triazolem lub benzotriazolem, które pełnią w tym przypadku rolę grup opuszczających. Następnie z estru metylowego kwasu 2-okso-chinolino-3-karbonylowego, który jest znany w literaturze, otrzymano w pierwszej kolejności hydrazyd **16**, a w dalszym etapie szereg nowych hydrazonów **17a-e**.

Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdzono za pomocą analizy spektroskopowej (¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR) oraz krystalograficznej monokryształów wykonanej dla 4 pochodnych (**2b**, **2d**, **8c** i **10a**). Z uwagi na fakt, iż na podstawie analizy widm ¹H-NMR i IR nie jest możliwe określenie geometrii wiązania C=N w hydrazonach (tj. konfiguracji hydrazonu *Z* lub *E*), doktorantka wykonała obliczenia kwantowo-chemiczne. Uzyskane wyniki badań teoretycznych pokazują, iż w warunkach fizjologicznych mogą występować oba izomery tj. *E* i *Z* z uwagi na niewielką różnicę w energii całkowitej (5,3 kcal/mol). Według obliczeń trwalszy okazał się izomer *Z*. Dla pełnego obrazu tych badań zasadne wydaje się przeprowadzenie analizy rentgenostrukturalnej przynajmniej dla jednego hydrazonu w celu sprawdzenia czy identyczna konfiguracja występuje w ciele stałym.

Następnym etapem pracy było określenie stabilności otrzymanych zasad Schiffa w środowisku wodnym za pomocą spektroskopii UV-Vis i wytypowanie struktur stabilnych chemicznie do badań biologicznych na liniach komórkowych nowotworów ludzkich. Na uwagę zasługuje fakt, iż doktorantka sama wykonała badania biologiczne pod kierunkiem

Pana Profesora Patricka J. Bednarskiego w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej i Chemii Medycznej Uniwersytetu w Greifswaldzie w Niemczech w ramach pobytu na stypendium programu Erasmus. Ocenę właściwości cytostatycznych otrzymanych związków przeprowadzono w oparciu o protokół badań biologicznych opracowany przez prof. P. J. Bednarskiego. Badania te wykonane zostały w dwóch etapach. W pierwszym etapie komórki nowotworowe inkubowano z nowo otrzymanymi związkami w formie roztworu w PBS o stężeniu 10 μM . W drugim etapie badano tylko związki, które przy stężeniu 10 μM hamowały w przynajmniej 50% wzrost komórek nowotworowych. Wstępne badania *in vitro* na komórkach nowotworowych pokazały, że działanie cytotoksyczne wykazują pochodne chinoliny zawierające w pozycji 2 pierścień benzotriazolu, natomiast analogi triazolowe są nietoksyczne względem linii komórkowych nowotworów ludzkich: DAN-G, LCLC-103H i SISO. Zdaniem doktorantki jest to wpływ lipofilowości na właściwości biologiczne badanych struktur. Niestety te przypuszczenia nie zostały potwierdzone przez doktorantkę odpowiednimi badaniami laboratoryjnymi. Myślę, że w dalszej pracy pani Martyna Korcz pokusi się o eksperymentalne wyznaczenie lipofilowości otrzymanych związków. Z spośród 70 otrzymanych pochodnych tylko niektóre wykazały aktywność przeciwnowotworową przy wartości IC_{50} w zakresie 1.23-7.39 μM . Jednocześnie należy zauważyć, iż te pochodne wykazały brak selektywności działania względem poszczególnych linii komórkowych. Najlepszą aktywność przeciwnowotworową wykazały dwie pochodne tj. hydrazon pirydylowy **4e** oraz *N*-benzoilohydrazon **6a**, które mogą być wykorzystane do badań nad mechanizmem działania cytotoksycznego.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej są obszerne i posiadają znaczny walor nowości. W trakcie realizacji swoich badań doktorantka wykazała duże umiejętności syntetyczne, umiejętne planowanie syntez kolejnych pochodnych, znajomość technik wydzielania i oczyszczania otrzymanych związków chemicznych. Przedstawione wyniki zasługują na pochwałę, jednakże z obowiązku recenzenta jestem zobowiązany także do uwag krytycznych. Poniżej pozwalam sobie wymienić kilka błędów edytorskich:

1. Str. 3, jest „Rozwój (chemio)terapiiprzeciwnowotworowej” – powinno być: Rozwój (chemio)terapii przeciwnowotworowej.
2. Str. 4, jest „III.1.1.Synteza pochodnych chinoliny Serii **II**” – powinno być: III.1.1.Synteza pochodnych chinoliny Serii **A**, tj. zgodnie z zapisem na str. 51.
3. Str. 4, jest „III.2.3. Synteza hydrazidu 16 i *N*-acylohydrazonów **17**” – powinno być: III.2.3. Synteza hydrazidu **16** i *N*-acylohydrazonów **17**. (*N*-pisane kursywą i analogicznie w całym tekście pracy)

4. Str. 5, jest „V.1.2.2. Otrzymywanie 2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylo)chinolino-3-karbaldehydu (**III**)” – powinno być: V.1.2.2. Otrzymywanie 2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylo)chinolino-3-karbaldehydu (**III**). Zgodnie z nomenklaturą związków organicznych rekomendowaną przez IUPAC przedstawianie nazwy rozpoczyna się od wskazywanych atomów wodoru określanych lokantem (lub lokantami jeśli jest ich więcej) i dużą literą *H* pisaną kursywą.
5. Str. 5, jest „V.1.2.3. Otrzymywanie 2-(1H-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-ylo)chinolino-3-karbaldehydu (**IV**)” – powinno być: V.1.2.3. Otrzymywanie 2-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-ylo)chinolino-3-karbaldehydu (**IV**); *H* i *d* zapisane kursywą.
6. Str. 5, jest „V.2. Badania biologiczne wstępne (primary screening) i poszerzone (secondary screening)” – powinno być: V.2. Badania biologiczne wstępne (*primary screening*) i poszerzone (*secondary screening*) czyli jak na str. 130.
7. Str. 6 jest „6- MP - Merkaptopuryna” – powinno być 6-MP-merkaptopuryna
8. Str. 6 jest „AAQMs – 2'-arylopodstawionych aminoalkilochinolinometanole” – raczej powinno być: 2'-arylopodstawione alkiloaminochinolino metanole.
9. Str. 6 jest „BVdUMP – (E)-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydino-5'-monofosforan”- powinno być: BVdUMP – (E)-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydino-5'-monofosforan.
10. Str. 7 jest „NB(1011)- (E)-5-(2-bromowinylo)-2'-deoxy-5'-uridylofenylo-L metoksyalaninyloamidofosforan” – raczej bardziej poprawnie powinno być: NB(1011)- (E)-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksy-5'-urydylofenylo-L-metoksyalaninyloamidofosforan.
11. Str. 7 dwa razy powtórzone skróty PTA. Ponadto 9H w nazwie chemicznej powinno być zapisane w formie „9*H*”.
12. Str. 7 jest „TBAF-fluorek tertbutyloamoniowy” – powinno być: TBAF- fluorek tetrabutylamoniowy. Jednocześnie należy zauważyć, iż wyjaśnienie skrótów w języku angielskim powinno być raczej zapisane w nawiasie po nazwie w języku polskim i z dodaniem skrótu „ang.” np. (ang. cyclooxygenase) lub należało nazwy w języku obcym pominąć.
13. Str. 8 jest „(...) podstawionych w pozycji 2 chinoliny ugrupowaniem pierścieniem 1,2,4-triazolu (**III**) lub benzotriazolu (**IV**)”- powinno być: „(...) podstawionych w pozycji 2 chinoliny pierścieniem 1,2,4-triazolu (**III**) lub benzotriazolu (**IV**)”.
14. Str. 8 jest „N'-arylosulfonohydrazonów (**7** i **8**) (.....) oraz oksyów (**11** i **12**).” – powinno być: N'-arylosulfonohydrazonów (**7** i **8**) (.....) oraz oksymów (**11** i **12**).

15. Str. 8 jest „zawierających a położeniu 2 ugrupowanie *O*-sulfonylohydroksylaminy” – powinno być: zawierających w położeniu 2 ugrupowanie *O*-sulfonylohydroksyloaminowe.
16. Str. 9 jest „70 nie opisanych wcześniej” – powinno być: 70 nieopisanych wcześniej. Podobnie jest na str. 90.
17. Str. 9 jest „W zamirzeniach”- powinno być: w zamierzeniach.
18. Str. 9 jest „zawierające ugrupowanie hydroksyloaminy” – powinno być: zawierające ugrupowanie hydroksyloaminowe.
19. Str. 13 jest „nie jest zdaniem łatwym i. obok....” - powinno być: nie jest zadaniem łatwym i obok....
20. Str. 15 jest „wywiedziono” – lepszym określeniem jest otrzymano.
21. Str. 16, użyto skrótów VEGFR i FGFR których nie ma w wykazie skrótów na str. 6-7, natomiast są wyjaśnione skróty EGFR i VEGF oraz FGF.
22. Str. 17 jest „2-chloro-chinolino-3-karbaldehyd (**I**)” – powinno być: 2-chlorochinolino-3-karbaldehyd (**I**).
23. Str. 18, na schemacie 1 struktura 2-(1,2,4-triazolo)chinoliny powinna być oznaczona jako III a nie II.
24. Str. 22 jest „aktywność w podczas” – powinno być: aktywność podczas.
25. Str. 25, struktura bosutynibu jest błędnie narysowana, brakuje jednej grupy metylenowej pomiędzy tlenem a *N*-metylopiperazyną. Ponadto błąd jest w nazwie, rysunek podpisano Busutynib zamiast Bosutynib.
26. Str. 28, bardziej poprawnym zapisem dla siarczanu dimetylu jest skrót $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ zamiast $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$.
27. Str. 29 jest „pod kirunkiem” – powinno być pod kierunkiem
28. Str. 30 jest „aktywnością cytostatyczną [32]” – powinno być: aktywnością cytostatyczną [32].
29. Str. 41 jest „Kombreatstatyna” – powinno być Kombrestatyna.
30. Str. 43 jest „wciąż wymagały zastosowania *Rybawiryny*” – powinno być: wciąż wymagają zastosowania *Rybawiryny*.
31. Str. 46 jest „przeciw-pasożytnicze” – powinno być: przeciw Pasożytnicze.
32. Str. 50 jest „Tymniemniej” – poprawnie pisze się: tym niemniej.
33. Str. 51 jest „z wytworzeniem związków tricyklicznych (.....) izokazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów typu **E**” – powinno być: z wytworzeniem związków trójcyklicznych (.....) izoksazolo[3,4-*b*]chinolin-3(1*H*)-onów typu **E**.

34. Str. 52 jest „sól chinoliniową” – poprawnie jest sól chinolinową.
35. Str. 53, na schemacie 7 indeksy 2 i 3 są zbędne, gdyż czynnikiem alkilującym jest tylko związek o wzorze ogólnym RX i brak jest reagentów o wzorze R^2X lub R^3X . Ponadto podstawnik R oznacza grupę metylową lub benzylową. Jednocześnie należy zaznaczyć, iż indeksy 1,2,3 oznaczające różne podstawniki R piszemy jako indeksy górne (R^1 , R^2 , R^3) a nie dolne, które oznaczają ilość przyłączonych podstawników R .
36. Str. 58 jest „ w dwóch formach tautomerycznych $1H$ i $2H$ ” raczej powinien być zapis: w dwóch formach tautomerycznych $N1$ i $N2$, gdyż w dalszej części pracy takie określenia dla tych tautomerów są stosowane.
37. Str. 62, na rysunku 9 są przedstawione izomery dla fenylohydrazonu **4c**, a nie dla pochodnej **6a**.
38. Str. 64 jest „ (...) katalitycznych ilości kwasu octowego (**10b** i **10b**).”- powinno być katalitycznych ilości kwasu octowego (**9b** i **10b**).
39. Str. 68 jest „Zazwyczaj utlenianie aldehydów prowadzane jest” – powinno być zazwyczaj utlenianie aldehydów prowadzone jest.
40. Str. 75 jest „przy atomie azotu hydrazonowego” – bardziej poprawnie jest przy hydrazynowym atomie azotu.
41. Str. 76, w tabeli 21 dwa razy jest przedstawiony wzrost populacji komórek LCLC-103H. Prawdopodobnie w ostatniej kolumnie powinna być linia komórkowa SISO.
42. Str. 89 jest hydrazonowów zamiast hydrazonów, semikarbazonowe i tiosemikarbazonowe, a powinno być semikarbazonów i tiosemikarbazonów.
43. Str. 91 jest „ z kwasem hydroksylamino-*O*-sulfonowym (HOSA)” – powinno być: z kwasem hydroksyloamino-*O*-sulfonowym (HOSA).
44. Str. 92 p. 6 jest „nadań rozwojowych” zamiast badań rozwojowych.
45. Str. 93, jest „ Analiza elementarna atomów węgla C, wodoru H, azotu N, tlenu O oraz siarki S została przeprowadzona przy użyciu (...)”- powinno być: Analiza elementarna atomów węgla C, wodoru H oraz azotu N została przeprowadzona przy użyciu (...). Brak jest w pracy analiz elementarnych dla tlenu i siarki.

46. Str. 96, powinien konsekwentnie być stosowany zapis $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ oraz cm^{-1} .
47. Str. 97, dla związku **2a** nie podano temperatury topnienia ani też nie określono w jakiej postaci był izolowany. Na krytyczną uwagę recenzenta zasługuje fakt pomijania w wielu przypadkach w części eksperymentalnej wartości stałych sprzężenia dla multipletowych sygnałów (dublet, triplet) na widmach $^1\text{H-NMR}$.
48. Dla dokładnego przedstawienia wyników analiz elementarnych zwyczajem jest obok zmierzonych zawartości poszczególnych atomów (C, H i N) prezentowanie ich teoretycznej zawartości w cząsteczce. W recenzowanej pracy zostały przedstawione wyniki analiz elementarnych, jednak autorka nie określiła czy są to wyniki teoretyczne czy zmierzone doświadczalnie.
49. W części eksperymentalnej dla pochodnych **3c**, **3d** i **3e** podane ilości sygnałów z widma $^{13}\text{C-NMR}$ nie są zgodne ze strukturami związków. Dla **3c** podano 18 sygnałów a powinno być 16, dla **3d** jest 16 sygnałów dla węgla aromatycznych, a powinno być 12, dla **3e** powinno być 17 sygnałów a jest 14. Być może w ostatnim przypadku sygnały nałożyły się.
50. W spisie literatury tytuły zacytowanych prac powinny być zaprezentowane w ujednoliconej formie oraz z zachowaniem poprawnego zapisu nazw związków heterocyklicznych. Dla przykładu w pozycji 30 jest: „Synthesis and anticancer evaluation of certain 4-anilino-furo[2,3-*b*]quinoline and 4-anilino-furo[3,2-*c*]quinoline derivatives” – powinno być Synthesis and anticancer evaluation of certain 4-anilino-furo[2,3-*b*]quinoline and 4-anilino-furo[3,2-*c*]quinoline derivatives. W inny sposób jest zapisany np. tytuł w pozycji nr 11: “Structural Diversity of Copper(II) Complex with N-(2-Pyridyl)Imidazolidin-2-Ones (Tiones) and Their *in Vitro* Antitumor Activity” – raczej lepszą formą jest “Structural diversity of copper (II) complex with N-(2-pyridyl)imidazolidin-2-ones (tiones) and their *in vitro* antitumor activity”.

Przedstawione powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy. Doktorantka zaprezentowała duży i oryginalny materiał eksperymentalny, a wybrane pochodne chinoliny mogą stanowić początek dla nowej grupy cytostatyków. Doktorantka jest współautorką kilku publikacji co świadczy o oryginalności otrzymanych wyników.

Reasumując stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytułach i Stopniach Naukowych i proszę Wysoką Radę o dopuszczenie Pani mgr inż. Martyny Korcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mariusz Mojzych

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mojzych'.