

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i Nazwisko Marcin Koba

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 1997            dyplom magistra inżyniera chemii uzyskany na podstawie pracy "Wpływ zatrucia katalizatora niklowego związkami siarki i fosforu na energię aktywacji uwodornienia oleju rzepakowego", Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
- 2003            stopień doktora nauk chemicznych uzyskany na podstawie rozprawy „Wiązanie się z DNA oraz jego międzylańcuchowe sieciowanie przez triazoloakrydony i aktynomycynę D”, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

### 3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2003 - 2004    pracownik naukowo-techniczny w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej
- 2005 - 2006    asystent w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 2006 - 2012    adiunkt w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
- Od 2012        adiunkt, p.o. Kierownika Katedry i Zakładu Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

**4. Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego wynikające z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Przedstawiony do oceny w postępowaniu habilitacyjnym jest cykl publikacji składający się z dziewięciu prac naukowych opublikowanych w latach 2010-2012, o łącznym wskaźniku Impact Factor równym 12,841 i punktacji MNiSW równej 176,000 dotyczący "Zastosowania chemometrycznej analizy danych do oceny aktywności biologicznej aktywnych przeciwnowotworowo pochodnych akrydonu".

1. **Koba M.**, Bączek T. (2011) Mechanisms of action of imidazoacridinone and triazoloacridinone derivatives in view of their biological activity., *Current Pharmaceutical Analysis*, 7: 286-295.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,155; Punktacja MNiSW: 13,000*
2. **Koba M.**, Bączek T. (2011) Physicochemical interaction of antitumor acridinone derivatives with DNA in view of QSAR studies., *Medicinal Chemistry Research*, 20: 1385-1393.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,271; Punktacja MNiSW: 15,000*
3. **Koba M.** (2012) Application of artificial neural networks for the prediction of antitumor activity of a series of acridinone derivatives., *Medicinal Chemistry*, 8: 309-319.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,496; Punktacja MNiSW: 20,000*
4. **Koba M.**, Belka M., Ciesielski T., Bączek T. (2012) Determination of lipophilicity of some antitumor acridinones supported by gradient high performance liquid chromatography method., *Central European Journal of Chemistry*, 10: 216-223.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,073; Punktacja MNiSW: 25,000*
5. **Koba M.**, Bączek T., Marszałł M.P. (2012) Importance of retention data from affinity and reverse-phase high-performance liquid chromatography on antitumor activity prediction of imidazoacridinones using QSAR strategy., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 64-65: 87-93.  
*Wskaźnik Impact Factor: 2,967; Punktacja MNiSW: 30,000*

6. **Koba M.**, Bączek T. (2010) Chemometric evaluation of the significance of molecular structural descriptors on binding of acridinone derivatives to DNA., *Letters in Drug Design & Discovery*, 7: 494-499.  
*Wskaźnik Impact Factor: 0,668; Punktacja MNiSW: 13,000*
7. **Koba M.**, Bączek T. (2012) Importance of some classes of molecular descriptors on classification of antitumor acridinones using factor analysis., *Medicinal Chemistry Research*, 21: 2854-2862.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,271; Punktacja MNiSW: 15,000*
8. **Koba M.**, Bączek T. (2012) The influence of lipophilicity on the classification of antitumor acridinones evaluated by principal component analysis., *Current Pharmaceutical Analysis*, 8: 157-174.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,155; Punktacja MNiSW: 20,000*
9. **Koba M.**, Bączek T., Ciesielski T. (2012) Influence of LC retention data on antitumor acridinones' classification evaluated by factor analysis method., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 15: 674-683.  
*Wskaźnik Impact Factor: 1,785; Punktacja MNiSW: 25,000*

Przedstawione osiągnięcie stanowi cykl badań składający się z dwóch głównych wątków badawczych:

1. Zastosowania metod chemometrycznych do przewidywania aktywności biologicznej akrydonów
2. Zastosowania metod chemometrycznych w celu klasyfikacji akrydonów w kontekście ich aktywności biologicznej i budowy chemicznej

#### **4.1. Wstęp**

Chemia kombinatoryczna (*combinatorial chemistry*), która łączy ze sobą dane uzyskane eksperymentalnie z możliwościami metod obliczeniowych, jest coraz częściej stosowana w projektowaniu nowych chemioterapeutyków o określonej aktywności farmakologicznej oraz jest wykorzystywana w celu uzupełnienia czy weryfikacji wyników badań eksperymentalnych, dotyczących określania aktywności oraz mechanizmów działania aktywnych biologicznie związków. Zastosowanie chemometrycznej wielowymiarowej

analizy danych uzyskanych metodami modelowania molekularnego w połączeniu z chromatograficznymi parametrami retencji, daje możliwość klasyfikacji związków w ujęciu ich aktywności biologicznej, farmakologicznej czy budowy chemicznej, a strategia QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, ilościowa zależność struktura-aktywność) czy QSRR (*Quantitative Structure-Retention Relationship*, ilościowa zależność struktura-retencja) zastosowane oddzielnie lub razem, coraz poważniej wykorzystywane są do przewidywania aktywności biologicznej (farmakologicznej) związków (leków). Możliwości, jakie daje zaawansowana chemometryczna analiza danych wykorzystałem do oceny aktywności biologicznej aktywnych przeciwnowotworowo wybranych pochodnych akrydonu, jak triazoloakrydony i imidazoakrydony.

Triazoloakrydony i imidazoakrydony są pochodnymi akrydonu charakteryzującymi się wysoką aktywnością cytotoksyczną w stosunku do wielu linii komórek nowotworowych, a przede wszystkim przeciwnowotworową *in vivo* w stosunku do wielu typów nowotworów jak białaczki, nowotwory prostaty czy piersi. Obecnie pochodna triazoloakrydonu C-1305 została wyselekcjonowana do rozszerzonych badań przedklinicznych, a pochodna imidazoakrydonu C-1311 (Symadex<sup>TM</sup>) przechodzi drugą fazę badań klinicznych, jako potencjalny lek w leczeniu nowotworów prostaty i piersi. Zarówno triazoloakrydony, jak i imidazoakrydony charakteryzują się wielokierunkowym mechanizmem działania związanym z oddziaływaniem z DNA. Związki te interkalują do DNA, wiążą się z DNA w mniejszej bruzdzie helisy DNA, tworzą wiązania kowalencyjne z DNA, hamują kompleksy rozszczepialne topoizomerazy II z DNA, jak również wywołują blok G2 w cyklu życiowym komórki indukując jej apoptozę czy katastrofę mitotyczną. Jednakże, nie ma jednoznacznych dowodów potwierdzających wyjątkową istotność któregoś z proponowanych mechanizmów działania omawianych związków dla ich aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej). Zebrane na podstawie literatury naukowej poglądy, dotyczące mechanizmów działania akrydonów (imidazoakrydonów i triazoloakrydonów) w kontekście ich aktywności biologicznej (cytotoksycznej i przeciwnowotworowej), przedstawiłem w pracy poglądowej [1].

#### **4.2. Zastosowanie metod chemometrycznych do przewidywania aktywności biologicznej akrydonów**

Wykorzystanie technik chemometrycznych, a przede wszystkim strategii QSAR daje, w oparciu o wyznaczone metodami modelowania molekularnego deskryptory opisujące budowę chemiczną i właściwości fizykochemiczne związków oraz w oparciu o wyznaczone

model QSAR, możliwość przewidywania aktywności biologicznej związków, co jest ważnym uzupełnieniem badań biologicznych aktywności związków i ma bardzo ważne znaczenie w przypadku projektowania nowych aktywnych biologicznie związków.

W przypadku omawianych pochodnych akrydonu, dysponując liczbą ponad 1300 deskryptorów uzyskanych w wyniku przeprowadzonego modelowania molekularnego z użyciem programu Dragon oraz dysponując danymi eksperymentalnymi aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej i zdolności do fizykochemicznego oddziaływania z DNA) dla grupy 20 związków, wyznaczyłem z wykorzystaniem analizy chemometrycznej metodą wielorakiej analizy regresji (*Multiple Linear Regression, MLR*) dwa istotne statystycznie modele QSAR, z których jeden pozwala na przewidywanie aktywności przeciwnowotworowej (przeciwbiałaczkowej) akrydonów, a drugi na przewidywanie zdolności tych związków do fizykochemicznego oddziaływania z DNA [2]. Ponadto, z wyznaczonych modeli QSAR wynika, że właściwości hydrofobowe (lipofilowość) oraz symetria (geometria) cząsteczki akrydonu są istotne dla aktywności przeciwnowotworowej zarówno triazoloakrydonów jak i imidazoakrydonów, a właściwości elektronowe i topologia cząsteczki akrydonu mają istotne znaczenie dla zdolności tych związków do stabilizacji drugorzędowej struktury DNA, co znajduje potwierdzenie w wynikach uzyskanych eksperymentalnie prezentowanych w literaturze [2].

W kolejnym etapie badań, dysponując również liczbą ponad 1300 deskryptorów uzyskanych w wyniku przeprowadzonego modelowania molekularnego z użyciem programu Dragon oraz dysponując danymi eksperymentalnymi aktywności przeciwnowotworowej dla grupy 71 pochodnych akrydonu, postanowiłem wyznaczyć istotny statystycznie model QSAR wykorzystując coraz bardziej popularną w analizie QSAR metodę sztucznych sieci neuronowych (*Artificial Neural Network, ANN*). W wyniku przeprowadzonych analiz metodą ANN, wyselekcjonowałem optymalny układ deskryptorów charakteryzujący właściwości fizykochemiczne akrydonów, który pozwolił na wyznaczenie istotnego statystycznie modelu sztucznej sieci neuronowej, charakteryzującego się dobrymi właściwościami predykcyjnymi zarówno dla serii danych uczących, walidujących, jak i testowych [3]. Wykonana analiza chemometryczna metodą ANN, dostarczyła także informacji na temat tych parametrów struktury cząsteczki akrydonu, które są istotne dla jej aktywności przeciwnowotworowej, co ma bardzo ważne znaczenie w przypadku projektowania nowych, aktywnych przeciwnowotworowo pochodnych imidazoakrydonu i triazoloakrydonu. Analiza wrażliwości deskryptorów wykorzystanych do zbudowania modelu omawianej sztucznej sieci neuronowej wykazała, że parametry opisujące zarówno właściwości geometryczne struktury akrydonu,

a także lipofilowość cząsteczki akrydonu są najistotniejsze dla analizowanej aktywności przeciwnowotworowej akrydonów [3]. Dane te potwierdzają wyniki uzyskane wcześniej metodą MLR [2] i wskazują na istotność dla aktywności przeciwnowotworowej akrydonów, zarówno geometrii cząsteczki akrydonu, co prawdopodobnie ma wpływ na siłę i charakter oddziaływania z DNA, jak i lipofilowości cząsteczki akrydonu, co prawdopodobnie ma wpływ na szybkość transportu związku do jądra komórkowego.

W związku z powyższym, wyznaczyłem nie tylko parametry lipofilowości akrydonów ( $\log P$ ) z wykorzystaniem różnych algorytmów obliczeniowych z użyciem programu VCCLab, ale dysponując grupą 21 pochodnych akrydonu wyznaczyłem również eksperymentalnie parametry lipofilowości ( $\log k_w$ ) tych związków. Wykorzystałem w tym celu metodę gradientowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej i różne kolumny chromatograficzne typu C18, a wyznaczone parametry retencji chromatograficznej akrydonów, posłużyły do obliczenia wartości parametrów lipofilowości  $\log k_w$  z użyciem programu DryLab [4]. Jednocześnie, uzyskane wyniki wskazują na istnienie zależności pomiędzy budową chemiczną omawianych akrydonów a ich lipofilowością, a wykonana analiza korelacyjna pokazała również, że w przypadku akrydonów istnieje silna korelacja liniowa pomiędzy parametrami lipofilowości wyznaczonymi metodami obliczeniowymi ( $\log P$ ) i tymi uzyskanymi na drodze eksperymentalnej ( $\log k_w$ ) [4].

W kolejnym etapie badań, wykonałem również analizę chromatograficzną imidazoakrydonów z wykorzystaniem metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej powinowactwa na kolumnach chromatograficznych z różnym wypełnieniem, takim jak fosfatydylocholina (kolumna typu IAM),  $\alpha_1$ -glikoproteina (kolumna typu APG) czy albumina (kolumna typu HSA) i wyznaczyłem czasy retencji chromatograficznej związków, które posłużyły do wyznaczenia parametrów lipofilowości ( $\log k$ ) [5]. Dysponując tak eksperymentalnie wyznaczonymi parametrami lipofilowości imidazoakrydonów ( $\log k_w$  i  $\log k$ ) i wykorzystując metodę wielorakiej analizy regresji (MLR), przeprowadziłem rozbudowaną analizę QSAR i QSRR, z której wynika, że istotny wpływ na aktywność przeciwnowotworową imidazoakrydonów ma ich aktywność cytotoksyczna, którą można przewidywać na podstawie parametrów retencji chromatograficznej tych związków, wyznaczonych eksperymentalnie z wykorzystaniem różnych typów kolumn chromatograficznych. Wyznaczone modele QSRR, pozwalają natomiast na predykcję tychże parametrów retencji, co pozwala ostatecznie na przewidywanie aktywności przeciwnowotworowej imidazoakrydonów bez konieczności wykonywania eksperymentów *in vitro* w hodowli komórkowej, jak i *in vivo* na zwierzętach [5].

#### **4.3. Zastosowanie metod chemometrycznych w celu klasyfikacji akrydonów w kontekście ich aktywności biologicznej i budowy chemicznej**

Jak dotąd, wykorzystanie zaawansowanej chemometrycznej wielowymiarowej analizy danych (a w szczególności metody składowych głównych (*Principal Component Analysis, PCA*) i metody analizy czynnikowej (*Factor Analysis, FA*)) uzyskanych metodami modelowania molekularnego w połączeniu z chromatograficznymi parametrami retencji, pozwoliło na klasyfikację wielu farmakologicznie aktywnych grup związków w ujęciu ich aktywności biologicznej, farmakologicznej i budowy chemicznej (patrz publikacje naukowe 7-11 z pkt. II.A, Załącznik 4).

W przypadku omawianych pochodnych akrydonu, wyznaczone z wykorzystaniem programu HyperChem deskryptory molekularne oraz wyznaczone z wykorzystaniem programu VCCLab parametry lipofilowości akrydonów, wykorzystałem do wykonania analizy chemometrycznej metodą analizy czynnikowej (FA), w wyniku której 24 zmienne zostały zredukowane do czterech istotnych statystycznie czynników (*factors*), które wyjaśniają ponad 90% informacji zawartej w danych wejściowych [6]. Ponadto, analiza istotności ładunków czynników wskazuje na decydujący wpływ parametrów lipofilowości na wartość czynnika pierwszego (*factor 1*), który wyjaśnia prawie 60% całkowitej wariancji. Najistotniejszym jest jednak to, że wykres rozrzutu punktów analizowanych związków pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 2, daje możliwość wyodrębnienia skupisk punktów (*clusters*), które świadczą o możliwości klasyfikacji akrydonów w ujęciu ich budowy chemicznej oraz zdolności do stabilizowania drugorzędowej struktury DNA będącej miarą siły fizykochemicznego oddziaływania akrydonów z DNA [6].

W kolejnym etapie badań, sprawdziłem możliwość klasyfikacji akrydonów w ujęciu ich aktywności przeciwnowotworowej na podstawie bazy danych składającej się z ponad 1300 deskryptorów molekularnych (zmiennych) uzyskanych z użyciem programu Dragon. Niestety, w wyniku przeprowadzenia chemometrycznej analizy danych zarówno metodą FA, jak i PCA dla tak dużej grupy zmiennych, nie udało się uzyskać istotnych statystycznie i możliwych do interpretacji wyników. Natomiast, wykonanie analiz chemometrycznych metodą analizy czynnikowej FA dla 16 różnych klas deskryptorów, wskazało na możliwość klasyfikacji omawianych akrydonów w ujęciu budowy chemicznej i aktywności biologicznej jedynie w przypadku dwóch rozpatrywanych oddzielnie klas deskryptorów, takich jak klasa deskryptorów konstytucyjnych (*constitutional descriptors*) i klasa deskryptorów będących wskaźnikami ładunku topologicznego cząsteczki (*topological charge indices descriptors*). Zarówno w przypadku pierwszej, jak i drugiej z wyznaczonych klas deskryptorów,

wielowymiarowa seria danych została zredukowana do dwóch istotnych statystycznie czynników (*factors*), które wyjaśniają odpowiednio ponad 94% i 87% informacji zawartej w danych wejściowych [7].

Jednocześnie, mając na uwadze znaczenie lipofilowości dla przewidywania aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej) akrydonów, w kolejnym etapie badań, sprawdziłem możliwość klasyfikacji akrydonów w kontekście ich budowy chemicznej i aktywności przeciwnowotworowej jedynie na podstawie samych parametrów lipofilowości log P obliczonych z wykorzystaniem różnych algorytmów w programie VCCLab, a w dalszym etapie badań, sprawdziłem także możliwość klasyfikacji akrydonów na podstawie tychże parametrów rozpatrywanych w połączeniu z wybranymi deskryptorami opisującymi właściwości konstytucyjne, geometryczne, czy topologiczne akrydonów [8].

W przypadku samych parametrów lipofilowości, wykorzystując metodę składowych głównych PCA, wykazałem możliwość redukcji 11 zmiennych wejściowych do trzech istotnych statystycznie czynników (*factors*), które wyjaśniają prawie 98% informacji zawartej w danych wejściowych, a analiza istotności ładunków czynników wskazuje na wpływ wszystkich analizowanych parametrów lipofilowości na wartość wszystkich trzech czynników. Wykres rozrzutu punktów analizowanych akrydonów pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 2, daje możliwość wyodrębnienia skupisk punktów (*clusters*), które dzielą analizowane związki na pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu. Dodatkowo, wykres rozrzutu punktów poszczególnych akrydonów pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 3, daje możliwość wyodrębnienia skupisk punktów (*clusters*), które świadczą o możliwości klasyfikacji akrydonów na pochodne, które zawierają i nie zawierają w swojej budowie chemicznej grupy hydroksylowej. Natomiast, rozrzut punktów pomiędzy płaszczyznę czynnika 2 i czynnika 3, pozwala na klasyfikację związków na grupę pochodnych akrydonu wykazujących dużą i umiarkowaną aktywność przeciwnowotworową oraz na grupę pochodnych akrydonu charakteryzujących się niską aktywnością przeciwnowotworową lub brakiem takiej aktywności [8].

W przypadku analizy PCA wykonanej dla danych parametrów lipofilowości w połączeniu z wybranymi deskryptorami wyselekcjonowanymi z programu Dragon, wykazałem możliwość redukcji 48 zmiennych wejściowych do pięciu istotnych statystycznie czynników (*factors*), które wyjaśniają ponad 96% informacji zawartej w danych wejściowych. Ponadto, analiza istotności ładunków czynników wskazuje na decydujący wpływ parametrów opisujących właściwości konstytucyjne akrydonów oraz parametrów charakteryzujących lipofilowość tych związków na wartość czynnika pierwszego, który wyjaśnia prawie 63%

całkowitej wariancji, podczas gdy na wartość czynnika drugiego, który wyjaśnia ponad 19% informacji zawartej w danych wejściowych, decydujący wpływ wykazują parametry opisujące geometrię i topologię struktury akrydonów. Wykres rozrzutu punktów analizowanych akrydonów pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 2, daje możliwość wyodrębnienia dwóch głównych skupisk punktów (*clusters*), które dzielą analizowane związki na pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu w ramach których, tworzone są mniejsze skupiska punktów (*subclusters*), które pozwalają na bardziej szczegółową klasyfikację imidazoakrydonów i triazoloakrydonów w ujęciu ich budowy chemicznej, a przede wszystkim wykazywanej aktywności przeciwnowotworowej. Ponadto, wykres rozrzutu punktów poszczególnych akrydonów pomiędzy płaszczyzny czynnika 1, czynnika 2 i czynnika 3, potwierdza możliwość klasyfikacji akrydonów na pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu [8].

Mając na uwadze fakt istotności lipofilowości dla przewidywania aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej) oraz możliwości klasyfikacji akrydonów, co pokazały wyniki prezentowane powyżej oraz dysponując wyznaczonymi wcześniej eksperymentalnie parametrami lipofilowości ( $\log K_w$ ) tych związków [4], sprawdziłem również możliwość klasyfikacji akrydonów w ujęciu ich aktywności biologicznej i budowy chemicznej na podstawie chromatograficznych parametrów retencji. Wykorzystując metodę analizy czynnikowej FA, wykazałem możliwość redukcji 32 zmiennych wejściowych, jakimi były parametry retencji chromatograficznej w połączeniu z parametrami lipofilowości akrydonów, do trzech istotnych statystycznie czynników (*factors*), które wyjaśniają ponad 93% informacji zawartej w danych wejściowych [9]. Analiza istotności ładunków czynników pokazała, że decydujący wpływ na wartość czynnika pierwszego, który wyjaśnia prawie 81% całkowitej wariancji mają uzyskane eksperymentalnie parametry retencji chromatograficznej akrydonów ( $\log K_w$ ), podczas gdy decydujący wpływ na wartość czynnika drugiego, który wyjaśnia prawie 8% informacji zawartej w danych wejściowych mają wybrane parametry lipofilowości akrydonów wyznaczone metodami obliczeniowymi ( $\log P$ ). Wykres rozrzutu punktów analizowanych akrydonów pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 2, daje możliwość wyodrębnienia dwóch głównych skupisk punktów (*clusters*), które dzielą analizowane związki na pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu, w ramach których tworzone są mniejsze skupiska punktów (*subclusters*), które pozwalają na bardziej szczegółową klasyfikację imidazoakrydonów i triazoloakrydonów w ujęciu ich budowy chemicznej i aktywności przeciwnowotworowej. Dodatkowo, wykres rozrzutu punktów analizowanych akrydonów pomiędzy płaszczyznę czynnika 1 i czynnika 2, daje możliwość wyodrębnienia

dwóch innych głównych skupisk punktów (*clusters*), dzielących analizowane związki na pochodne akrydonu, które zawierają i nie zawierają w swojej budowie chemicznej grupy hydroksylowej. Ponadto, z tego samego wykresu rozrzutu punktów można wyodrębnić skupiska, które pozwalają na klasyfikację związków na grupę pochodnych akrydonu wykazujących dużą i umiarkowaną aktywność przeciwnowotworową oraz na grupę pochodnych akrydonu charakteryzujących się niską aktywnością przeciwnowotworową lub niewykazujących takiej aktywności [9].

#### **4.4. Podsumowanie**

Podsumowując, przedstawione przeze mnie wyniki badań [1-9] dotyczące pochodnych akrydonu dowodzą, że zastosowanie chemometrycznej analizy danych do oceny aktywności biologicznej i fizykochemicznej tej grupy związków, a w tym użycie w analizie QSAR i QSRR metod chromatografii cieczowej HPLC z zastosowaniem różnych typów faz stałych (adsorbentów) oraz metod komputerowych, a w tym metod modelowania molekularnego struktur związków (leków) i uzyskanie wielu parametrów (deskryptorów molekularnych) charakteryzujących zarówno budowę i właściwości chemiczne jak i właściwości biologiczne modelowanego związku, w połączeniu z metodami statystycznymi (chemometrycznymi) takimi jak wieloparametrowa (wieloraka) analiza regresji (MLR), sztuczne sieci neuronowe (ANN) czy metody składowych głównych (PCA) lub analizy czynnikowej (FA), dają możliwość przewidywania aktywności biologicznej (farmakologicznej) czy czasów retencji akrydonów oraz ich klasyfikację w ujęciu aktywności biologicznej i budowy chemicznej. Ponadto, wykorzystanie tych technik chemometrycznych w oparciu nie tylko o wyznaczone deskryptory molekularne, ale także uzyskane z wykorzystaniem różnych algorytmów parametry lipofilowości, pozwoliło na klasyfikację przeciwnowotworowo aktywnych pochodnych akrydonu w ujęciu ich aktywności biologicznej, budowy chemicznej i zdolności do fizykochemicznego oddziaływania z DNA, co jest ważnym uzupełnieniem badań biologicznych dotyczących mechanizmów działania tych związków w kontekście nie tylko ich oddziaływania z DNA, ale także aktywności przeciwnowotworowej oraz projektowania nowych przeciwnowotworowo aktywnych pochodnych akrydonu, jak również innych aktywnych przeciwnowotworowo związków. Zaawansowana analiza chemometryczna, dostarczyła także informacji na temat tych parametrów struktury cząsteczki akrydonu, które są istotne dla jej aktywności biologicznej czy określonego mechanizmu działania, co ma bardzo ważne znaczenie w przypadku projektowania nowych chemioterapeutyków. Dodatkowo, wykorzystanie metody wielowymiarowej analizy danych, umożliwiło określenie

znaczenia parametrów lipofilowości wyznaczonych metodami obliczeniowymi, jak i eksperymentalnie metodami HPLC dla aktywności przeciwnowotworowej akrydonów oraz pozwoliło na klasyfikację tych związków w układzie budowa chemiczna-aktywność przeciwnowotworowa. Natomiast, przeprowadzenie rozbudowanej analizy QSAR i QSRR na podstawie danych chromatograficznych uzyskanych z użyciem różnych kolumn chromatograficznych, pozwoliło na przewidywanie aktywności przeciwnowotworowej imidazoakrydonów jedynie na podstawie parametrów retencji, a co najważniejsze, przewidywanie tychże parametrów, pozwoliło ostatecznie na przewidywanie aktywności przeciwnowotworowej tych związków bez konieczności wykonywania eksperymentów *in vitro* w hodowli komórkowej, jak i *in vivo* na zwierzętach. Dowodzi to, że zastosowanie strategii QSAR i QSRR oddzielnie lub razem, daje duże możliwości aplikacyjne w projektowaniu nowych aktywnych przeciwnowotworowo pochodnych akrydonu oraz innych aktywnych biologicznie związków (leków) o określonej aktywności farmakologicznej.

## **5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze**

### **5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy magisterskiej, a dotyczące wpływu zatrucia katalizatora niklowego związkami siarki i fosforu na energię aktywacji reakcji uwodornienia oleju rzepakowego, zostały zaprezentowane w formie doniesienia konferencyjnego [A1]<sup>1</sup>.

Po przyjęciu w roku 1997 na studia doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, podjąłem w Katedrze Technologii Leków i Biochemii pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Jerzego Konopy badania naukowe, dotyczące mechanizmów działania związków o aktywności przeciwnowotworowej w kontekście ich oddziaływania z DNA, a w szczególności zdolności do fizykochemicznego wiązania z DNA, jak i tworzenia kowalencyjnych międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA, jako czynnika istotnego dla ich aktywności biologicznej (cytotoksycznej i przeciwnowotworowej). Badania te, dotyczyły znanego antybiotyku przeciwnowotworowego aktynomycyny D oraz triazoloakrydonów będących nową grupą pochodnych akrydonu o aktywności przeciwnowotworowej, a także innych aktywnych przeciwnowotworowo związków takich jak CC-1065. W toku przeprowadzonych badań, wykazałem zdolność aktynomycyny D do tworzenia

---

<sup>1</sup>jako [P] oznaczono publikacje naukowe z pkt. II.A, Załącznik 4; jako [M] oznaczono publikacje naukowe z pkt. II.M, Załącznik 4; jako [A] oznaczono doniesienia naukowe z pkt. III.B, Załącznik 4.

międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA w komórkach bakteryjnych *Bacillus caereus* w sposób zależny od dawki oraz zdolność tworzenia przez aktynomycynę D takich wiązań w komórkach fibroblastów NIH 3T3 znajdujących się w stanie inhibicji kontaktowej o obniżonej aktywności topoiizomerazy II. Jednocześnie wykazałem, że utworzone wiązania sieciujące DNA są termolabilne i alkalilabilne, a wcześniejsza metaboliczna aktywacja aktynomycyny D jest niezbędna dla utworzenia wiązań sieciujących DNA przez ten związek. Ponadto, w toku badań nad mechanizmem działania triazoloakrydonów, wykazałem że związki te wiążą się niekowalencyjnie z DNA przez interkalację do DNA oraz wiązanie się w małym rowku podwójnej helisy DNA, a niekowalencyjne wiązanie się triazoloakrydonów z DNA, nie jest decydującym procesem odpowiedzialnym za ich aktywność cytotoksyczną i przeciwnowotworową. Wykazałem również zdolność triazoloakrydonów do tworzenia międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA, która zachodzi po ich wcześniejszej metabolicznej aktywacji i która to zdolność prawdopodobnie wymagana jest w mechanizmie działania i ma istotne znaczenie dla aktywności biologicznej triazoloakrydonów [A2-A6]. Efektem innych badań, było wykazanie zdolności związku CC-1065 do indukowania powstawania wiązań sieciujących DNA komórek nowotworowych, do utworzenia których, wymagany jest metabolizm komórkowy tego związku [P1]. Większość uzyskanych wyników, zawarłem w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Wiązanie się z DNA oraz jego międzyłańcuchowe sieciowanie przez triazoloakrydony i aktynomycynę D”, której promotorem był prof. dr hab. inż. Jerzy Konopa i którą obroniłem w 2003 roku.

## **5.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora**

Tematyka moich badań bezpośrednio po doktoracie nadal dotyczyła aktynomycyny D i pochodnych triazoloakrydonu w kontekście ich oddziaływania z DNA, a ponadto rozszerzona została o kolejną grupę pochodnych akrydonu, jakimi były również aktywne przeciwnowotworowo imidazoakrydony i dotyczyła badania zdolności tych związków do tworzenia kowalencyjnych międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA w kontekście ich aktywności biologicznej. Rezultatem tych badań, są dwie prace przeglądowe dotyczące zarówno mechanizmów działania aktynomycyny D [M1], jak i wpływu modyfikacji struktury chemicznej aktynomycyny D na jej aktywność biologiczną [M2], a także praca eksperymentalna dotycząca możliwości badania zdolności aktynomycyny D do tworzenia kowalencyjnych międzyniciowych wiązań sieciujących DNA w układzie bezkomórkowym z wykorzystaniem liniowego DNA plazmidowego i z użyciem metody elektroforetycznej, co potwierdziło istotność metabolizmu komórkowego dla utworzenia wiązań sieciujących

DNA przez ten związek [M3]. Ponadto, dwie prace eksperymentalne dotyczące zdolności pochodnych triazoloakrydonów zarówno do niekowalencyjnego, jak i kowalencyjnego oddziaływania z DNA [P2, P4] oraz dwa doniesienia konferencyjne dotyczące zdolności pochodnej imidazoakrydonu C-1311 (Symadex<sup>TM</sup>), znajdującej się obecnie w drugiej fazie badań klinicznych, do indukowania w sposób zależny od stężenia międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA w komórkach różnych rodzajów nowotworów pochodzenia ludzkiego [A7, A8]. Dodatkowo, prowadziłem badania zmierzające do modyfikacji stosowanej przeze mnie metody oznaczania międzyłańcuchowych wiązań sieciujących DNA, czego efektem jest publikacja dotycząca ograniczonego zastosowania barwnika fluorescencyjnego PicoGreen do ilościowego oznaczaniu dwuniciowego DNA (dsDNA) w obecności związków interkalujących do DNA [P3].

Obecnie, główną tematykę moich badań stanowi możliwość wykorzystania chemometrycznej analizy danych w celu klasyfikacji związków w ujęciu ich aktywności farmakologicznej i budowy chemicznej, czy przewidywania ich aktywności biologicznej [A11, A12, P6-P11]. Efektem tych badań są prace, w których przedstawiono możliwości wykorzystania zaawansowanej chemometrycznej analizy danych (metoda składowych głównych PCA (*Principal Component Analysis*) i metoda analizy czynnikowej FA (*Factor Analysis*)) uzyskanych metodami modelowania molekularnego (deskryptory molekularne charakteryzujące między innymi budowę i właściwości fizykochemiczne modelowanego związku) rozpatrywanych indywidualnie [P7-P11], jak i w połączeniu z chromatograficznymi parametrami retencji (parametry  $\log k$  i  $\log k_w$  charakteryzujące lipofilowość związków) uzyskanymi z wykorzystaniem różnych kolumn chromatograficznych (kolumny z wypełnieniem typu C8, C18, DIOL, PEG, CATION, ANION, IAM, AGP, HSA) [P8-P11], w celu klasyfikacji różnych grup związków, takich jak pochodne chinolonu, jak i leków przeciwbólowych, przeciwzapalnych, nasercowych, przeciwbakteryjnych, zarówno w ujęciu ich aktywności farmakologicznej, jak i budowy chemicznej. Z uzyskanych danych wynika również, że chromatograficzne parametry retencji wyznaczone z wykorzystaniem różnych rodzajów adsorbentów (które determinują rodzaj i siłę oddziaływań z badanym związkiem) w zależności od grupy związków mają istotny, a czasami nawet decydujący wpływ na możliwość ich klasyfikacji w ujęciu aktywności farmakologicznej. Proponowana strategia, może być ważnym uzupełnieniem badań biologicznych dotyczących aktywności farmakologicznej związków, a także dostarczać ważnych informacji w procesie racjonalnego projektowania nowych potencjalnych leków o określonej aktywności farmakologicznej.

Inna, niezależna tematyka moich badań, dotyczy również możliwości wykorzystania przede wszystkim metod wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej HPTLC i spektrofotometrii pochodnych widma oraz metod chromatografii cieczowej, takich jak HPLC i LC-MS do oznaczania leków w preparatach farmaceutycznych. Badania te umożliwiły opracowanie metod HPTLC z detekcją densytometryczną pozwalających na rutynowe ilościowe oznaczanie w preparatach farmaceutycznych takich leków jak, oksazepam [P5], nitrazepam [P12], lormetazepam [A14], inhibitory fosfodiesterazy III [A9], naftazolina [A18, P17], lamotrygina [A19, P16], czy topiramatu [A20, P15]. Natomiast, opracowane metody spektrofotometrii pochodnych widma pozwalają na analizę ilościową takich leków jak, bisfosfoniany [M4], inhibitory fosfodiesterazy III [A9], piracetam [A10], trimetazydyna [A13], oksazepam [P9], czy lamotrygina [A19, P16]. Opracowano również metody HPLC pozwalające na oznaczanie w preparatach farmaceutycznych lormetazepamu [A14] oraz lamotryginy [A19, P16], a także metodę LC-MS pozwalającą na oznaczanie topiramatu [A20, P15].

Inne, prowadzone przeze mnie badania dotyczą opracowania i wykorzystania metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania stężenia markerów chorobotwórczych w surowicy krwi, takich jak żelazo niezwiązane z białkiem transferyną (non-transferrin bound iron). Rezultatem tych badań są dwie prace przeglądowe dotyczące białka hepcydyny istotnego w metabolizmie żelaza [P13] i żelaza niezwiązanego z białkiem transferyną (NTBI) [P14], w kontekście ich biologicznego znaczenia i aktywności oraz metod oznaczania, a także prace eksperymentalne dotyczące oznaczania NTBI w surowicy krwi z wykorzystaniem opracowanej metody HPLC oraz jego znaczenia w fizjopatologii noworodków [A15-A17, M5, P18].

W chwili obecnej, publikacja dotycząca również zastosowania chemometrycznej analizy danych do oceny aktywności biologicznej aktywnych przeciwnowotworowo pochodnych akrydonu, a przedstawiająca możliwość wykorzystania metody MARSplines (*Multivariate Adaptive Regression Splines, Wielozmienna regresja adaptacyjna z użyciem funkcji sklepanych*) do przewidywania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych akrydonu, została przyjęta do druku w *Medicinal Chemistry* (Koba M., Bączek T., The evaluation of multivariate adaptive regression splines for the prediction of antitumor activity of acridinone derivatives., *Med. Chem.*, 2013, in press). Natomiast, manuskrypty publikacji (Stasiak J., Koba M., Kawczak P., Bączek T., Marszał M., Bucinski A., Bober L., The comparison between the calculated and HPLC-predicted lipophilicity parameters for the selected three groups of drugs., *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, under review),

(Słomka A., Koba M., Korbal P., Marszał M., Żekanowska E., Lack of desferrioxamine chelatable iron in cord blood of the newborns: the possible role of hepcidin., *BiOMARKERS*, under review) i (Szatkowska P., Koba M., Kośliński P., Szablewski M., Molecular Imprinted Polymers' Applications. A Short Review., *Mini-Rev. Org. Chem.*, under review) znajdują się w recenzji, a w przygotowaniu są kolejne publikacje.

Ponadto, aktualnie prowadzę badania dotyczące wykorzystania parametrów retencji chromatograficznej uzyskanych na różnych typach kolumn chromatograficznych (w tym na kolumnach typu HILIC) w połączeniu z chemometryczną analizą danych do przewidywania aktywności biologicznej wybranych związków przeciwnowotworowych oraz niezależne badania nad optymalizacją metody HPLC oznaczania różnych form żelaza w materiale biologicznym, a także uczestniczę w projekcie realizowanym w ramach grantu NCN dotyczącym wykorzystania technik chemometrycznych jako narzędzi selekcji nowych pochodnych arylopiperazyny podczas poszukiwania nowych leków przeciwdepresyjnych.

O aktualności przedstawionych powyżej osiągnięć naukowo-badawczych świadczą, uzyskane w latach 2010-2012 nagrody indywidualne i zespołowe Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (pkt. II.J, Załącznik 4).

### **5.3. Podsumowanie**

Podsumowując, mój dorobek naukowy przed doktoratem obejmował 1 publikację i 6 doniesień konferencyjnych o sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym 3,348 i punktacji MNiSW równej 13, natomiast po doktoracie na dzień 31 stycznia 2013 roku obejmuje 31 publikacji i 14 doniesień konferencyjnych o sumarycznym wskaźniku Impact Factor wynoszącym 37,495 i 567 punktach MNiSW, co daje całkowitą wartość wskaźnika Impact Factor równą 41,285 i 580 punktów MNiSW. Liczba cytowań moich publikacji na dzień 31 stycznia 2013 roku według bazy Web of Science wynosi 96 (wg Scopus 91), a indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science wynosi 6 (wg Scopus 6).

