



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

WYDZIAŁ

FARMACEUTYCZNY

Zakład Biotechnologii

15-089 Białystok, ul. Kilińskiego 1

Tel. (85) 748-57-01, FAX (85) 879-

57-18

aniabiel@umb.edu.pl

Prof. dr hab. n. farm. Anna Bielawska

Białystok, 10.12.2020

Ocena pracy doktorskiej mgr Patryka Kasza pt. "Synteza nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych oraz znakowanie azydotymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym w ramach koncepcji click chemistry"

Od dwóch dekad click chemistry zapewnia naukowcom możliwość syntezy nowatorskich materiałów. Koncepcja click chemistry została opracowana, aby pomóc sprostać wymaganiom syntezy nowych bibliotek związków w ramach której moduły molekularne łączone są ze sobą, tworząc większe, zdefiniowane struktury w sposób szybki i wydajny. Wykorzystuje się pary grup funkcyjnych, które szybko i selektywnie reagują ze sobą w łagodnych warunkach eksperymentalnych. Wybór każdej reakcji opiera się na jej selektywności, reaktywności, biokompatybilności i stabilności. Celem tej nowatorskiej techniki było wygenerowanie selektywnych i modułowych substratów, które mogą być stosowane niezawodnie zarówno w małej, jak i dużej skali syntetycznej. Sharpless i inni badacze przekazali rygorystyczny zestaw kryteriów dla procesów lub reakcji, aby zaliczyć je do koncepcji click chemistry. Muszą to być reakcje modułowe o szerokim zakresie zastosowania przebiegające z wysokimi wydajnościami, dostarczające, co najwyżej nieszkodliwych produktów ubocznych, które można oddzielić metodami innymi niż chromatograficzne (np. krystalizacja lub destylacja). Reakcje powinny przebiegać w łagodnych warunkach, być stereospecyficzne, a produkt musi pozostać stabilny w warunkach fizjologicznych. Wśród reakcji, które spełniają te kryteria dipolarna cykloaddycja [3+2] pozostaje czołowym przykładem takiej reakcji ze względu na swoją prostotę, stabilność

kinetyczną i tolerancję dla różnych grup funkcyjnych i warunków reakcji. Badania nad 1,3-dipolarną cykloaddycją prowadził w latach 60-tych XX wieku wielki chemik organik Ralf Huisgen. 1,3-dipolem mogą być związki zawierające, jako atom centralny azot np.: ylidy, nityle, iminy nitrylu, tlenki nitrylu, azydki, ylidy azometinowe, nitrony. Dipolarofilami są najczęściej alkeny i alkiny lub ich heteroanalogi. Spośród tych różnych typów reakcji, to właśnie reakcja pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem, pozostająca centralnym aspektem syntetycznym omawianego doktoratu, zyskała największą popularność. Dzięki dużej różnorodności, szybkości reakcji, prostocie jej prowadzenia i szerokiemu wachlarzowi zastosowań, stała się kluczem do produkcji nowych materiałów oraz szerokiego wachlarzu bibliotek związków o potencjalnej aktywności biologicznej. Gdy prawie 19 lat temu, w 2001 roku, Meldal i Sharpless odkryli katalityczny wpływ jonów miedzi(I) na reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (*copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*), oznaczana skrótowo CuAAC, weszła na stałe do kanonu podstawowych reakcji chemii medycznej.

Reakcja CuAAC może być stosowana w procesie biotransformacji żywych komórek ze względu na różnorodność warunków prowadzenia reakcji, wysoką wydajność zachodzącego sprzęgania azydku z alkinem oraz fizjologiczną bierność substratów i produktów reakcji. Reakcja zachodzi pomiędzy organicznym azydkiem a terminalnym alkinem w obecności jonów miedzi (I) z wytworzeniem 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu, w przeciwieństwie do reakcji niekatalizowanej, która przebiega w wyższych temperaturach, tworzącej mieszaninę regioizomerów 1,4- i 1,5-triazolu. Szybkość tej reakcji jest 10^7 razy większa niż w przypadku konwencjonalnej reakcji termicznej, co oznacza, że przebiega ona wydajnie w temperaturze pokojowej. Niestety reakcje CuAAC nie w pełni spełniają kryteria istotne w chemii bioortogonalnej, gdyż jony miedzi(I) są toksyczne dla organizmów żywych. Chemia bioortogonalna, dynamicznie rozwijana w chwili obecnej, obejmuje reakcje, które nie zakłócają procesów biologicznych zachodzących w organizmie. Reakcje te muszą zachodzić w środowisku wodnym, substraty muszą reagować szybko i selektywnie w warunkach fizjologicznych i nie oddziaływać z substancjami znajdującymi się w organizmie. Na początku XX wieku wykazano, że niektóre reakcje CuAAC posiadają autokatalityczny charakter. Jest to spowodowane właściwościami katalitycznymi powstających w reakcji politriazoli, które kompleksują jony Cu(I) oraz stabilizują +I stopień utlenienia metalu. Dodatek do reakcji N-donorowych ligandów chelatujących jony miedzi(I), prowadzi do zmniejszenia ilości miedzi oraz zwiększa wydajność i efektywność reakcji. Analizując te zagadnienie w Katedrze Chemii Organicznej UJ CM w zespole prof. Marka Cegły otrzymano ligand AMTC, 2-[4-(dimetyloaminometylo)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]cykloheksan-1-ol, pozwalający znacząco

obniżyć stosowaną w reakcji ilość miedzi przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej wydajności reakcji. To znaczące osiągnięcie podlega ochronie patentowej w Europie i na terenie Stanów Zjednoczonych. Tym samym reakcja katalizowanej miedzią (I) cykloaddycji azydków do alkinów z udziałem liganda AMTC stanowi wydajne narzędzie syntetyczne, stosowane z dobrym skutkiem również w przedstawionej rozprawie doktorskiej. Hein i Fokin wskazali alternatywę dla beztlenowych warunków stosowania soli Cu (I) poprzez zastosowanie łatwo dostępnych i trwałych soli Cu (II), takich jak siarczanu miedzi (II) lub octan miedzi (II), w obecności łagodnych reduktorów, takich jak askorbinian sodu, hydrochinon czy też tris(karboksyetylo)fosfina. Tolerancja na tlen, wodę, szeroki wachlarz pH charakterystyczny dla układów biologicznych czynią reakcje CuAAC praktycznymi sposobami koniugacji leków i aktywnych biocząsteczek. Powstający w wyniku reakcji cykloaddycji 1,2,3-triazol posiada szereg interesujących właściwości. Jest on elementem strukturalnym trwałym w szerokim zakresie wartości pH i mało wrażliwym na temperaturę roztworów. Nie ulega rozpadowi pod wpływem czynników utleniających ani hydrolizie w warunkach fizjologicznych. Dodatkowo sama reakcja CuAAC charakteryzuje się bioortogonalnością, co jest kluczowe w przypadku reakcji zachodzących w środowisku *in vivo*. Wszystkie powyższe czynniki, wraz ze spełnieniem kryteriów click chemisty sprawiły, że reakcja CuAAC wspomagana kompleksującymi jony miedzi N-donorowymi ligandami, stała się doskonałym narzędziem syntetycznym do łatwego i wydajnego łączenia cząsteczek.

Doktorant w przedstawionej pracy wykorzystał zalety tej techniki syntetycznej do rozwinięcia metod znakowania fluorescencyjnego, co może przyczynić się do poznawania mechanizmów działania leków czy też procesów biochemicznych zachodzących w żywej komórce. Śledzenie losów poprzez wizualizację tych ważnych biologicznie związków jest kluczowe dla zrozumienia zachodzących procesów i mechanizmów biologicznych, a także rozwijania nowych terapii farmakologicznych. Fluorescencyjne biokoniugaty mogą być wykorzystywane w szerokim spektrum technik obrazowania (np. mikroskopia fluorescencyjna), czy też metod spektroskopowych (np. bezpromienistego rezonansowego transferu energii-FRET). Wprowadzenie fluoroforu do związku aktywnie biologicznego stwarza wiele możliwości analizy, obrazowania i śledzenia mechanizmu fluorescencyjnego biokoniugatu. Produktem leczniczym, szeroko wykorzystywanym w znakowaniu fluorescencyjnym jest posiadająca grupę azydkową 3'-azydo-3'-deoksytymidyna, zwyczajowo nazywana azydotymidyną (AZT). Związek ten stanowi główny obiekt zainteresowania w niniejszej pracy doktorskiej. Azydotymidyna została otrzymana jako potencjalny lek przeciwnowotworowy przez Jerome'a Horowitza w 1964, jednakże nie znalazła zastosowania

w tej dziedzinie. W 1987 roku azydetymidyna została zarejestrowana, jako pierwszy lek przeciwwirusowy blokujący skutecznie namnażanie się wirusa HIV. Stosowana samodzielnie prowadzi jednak do wyodrębnienia szczepów wirusa opornych na działanie leku. Obecnie stosowana jest jedynie w terapii skojarzonej. W 1995 roku zainicjowano pierwszą skojarzeniową wysoko aktywną terapię antyretrowirusową (HAART) z udziałem azydetymidyny oraz grupy związków obejmujących inhibitory proteazy. Aktualnie terapię wielolekową HAART prowadzi się w oparciu o podawanie pacjentom nie mniej niż trzech leków antyretrowirusowych z trzech możliwych grup: nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (w tym azydetymidyny), nienukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy oraz inhibitorów proteazy.

Wybór tematu pracy doktorskiej mgr Patryka Kasza pt. ” Synteza nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych oraz znakowanie azydetymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym w ramach koncepcji click chemistry” obejmuje więc zagadnienia istotne dla chemii medycznej o dużych walorach aplikacyjnych.

Układ przedstawionej do recenzji pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich, z podziałem na rozdziały: Przegląd Literaturowy, Cel i Plan Badań, Wyniki i Dyskusję, Część Eksperymentalną, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Bibliografię. W rozprawie znajdziemy także wykaz stosowanych skrótów. Praca doktorska mgr Patryka Kasza jest obszerna, liczy 153 stron tekstu, w których zawartych jest 50 rysunków i 3 tabele. Tabele i ryciny umieszczono w tekście, co znacznie ułatwia korzystanie z nich w trakcie czytania. Doktorant posługuje się precyzyjnym, zwięzłym językiem naukowym, swobodnie poruszając się w terminologii omawianych zagadnień. Zwraca uwagę wielka staranność graficzna i edytorska pracy. Piśmiennictwo liczy 224 pozycji i jest właściwie dobrane i cytowane. We wstępie pracy, liczącym 40 stron, Doktorant przedstawia informacje szeroko naświetlające zakres tematyczny podjętych badań. W rozdziałach tych Autor omawia zagadnienia dotyczące zjawiska fluorescencji, omawia barwniki fluorescencyjne, metody łączenia barwnika ze znakowanymi cząsteczkami oraz zastosowanie znakowanych związków chemicznych. W dalszej części wstępu Doktorant wprowadza czytelnika w zagadnienia koncepcji click chemistry. Informacje zawarte w tej części pracy stanowią wyczerpujące, jasne i przejrzyste wprowadzenie do części doświadczalnej dysertacji. Podsumowując, rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnego piśmiennictwa, ogromnej wiedzy, solidnym i dogłębnym przygotowaniu Doktoranta do podjętych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Patryka Kasza jest rozwinięcie metodologii znakowania fluorescencyjnego azydetymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym w ramach

koncepcji *click chemistry*. W pierwszym etapie, do badań wybrano barwnik fluorenylowy. Ważnym etapem tych badań było sprawdzenie użyteczności nowego barwnika w chromatograficznej analizie ilościowej azydetymidyny. Kolejną grupę barwników rozważanych w przedstawionej pracy doktorskiej są barwniki z grupy Safirinium. Po raz pierwszy barwniki te zostały otrzymane w 2013 roku przez grupę badawczą dr hab. Jarosława Sączewskiego z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Barwniki mają postać soli wewnętrznej, gdzie stałym fragmentem jest układ bicykliczny z 1,2,4-triazolem oraz dwupodstawiony IV-rzędowy atom azotu. Celem tego etapu rozprawy doktorskiej była modyfikacja barwników Safirinium w pochodne alkinowe i azydkowe możliwe do wykorzystania w *click chemistry*.

Badania nad fluorenylem i jego triazolowymi pochodnymi zostały podzielone na dwa elementy, pierwszy pilotażowy dotyczył badań nad wprowadzeniem fragmentu fluorenylu do pochodnych 1,2,3-triazolu, będących produktami głównej reakcji cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi(I). Drugi aspekt badań dotyczył syntezy barwnika z fragmentem fluorenylowym, użytecznego do reakcji CuAAC.

Synteza spirooksazolidynowych substratów do reakcji znakowania fluorescencyjnego została zaprojektowana w czterech etapach. W pierwszym etapie otrzymano *trans*-2-azydocykloheksanol stosując zmodyfikowaną metodą Christoffersa i współpracowników. Następnie przeprowadzono reakcję cykloaddycji z zastosowaniem protokołu syntetycznego wykorzystującego ligand AMTC. Reakcje przeprowadzono z okt-1-ynem, non-1-ynem, tetradec-1-ynem i fenyloacetylenem, używając 0,5-5 - molowy roztwór CuSO_4 i 1-10 - molowy roztwór AMTC, uzyskując końcowe produkty z końcową wydajnością od 82 do 92%. W następnym etapie planowano utlenić otrzymane triazolowe pochodne alkoholi do ketonów. Etap ten wymagał długiej optymalizacji, gdyż takie metody jak utlenianie Cornfortha, Stevensa, Swerna, a także użycie wodoronadtlenku *t*-butylu, nadtlenu wodoru lub kompleksów miedzi(II) okazało się nieefektywne. Dopiero zastosowanie nadjodanu Dess-Martina zapewniło wysokie wydajności końcowego produktu powyżej 95%. Ostatnim etapem syntezy było utworzenie fragmentu spirocyklicznego we wcześniej otrzymanych związkach. Otrzymane ketony poddano reakcji z nadmiarem etanoloaminy w obecności węgla potasu ułatwiającym utworzenie pierścienia. Analiza widm ^1H NMR otrzymanych produktów wykazała obecność distereoizomerów *cis* i *trans* spirooksazolidyn w stosunku równomolowym. Etapem syntetycznym kluczowym dla niniejszej pracy doktorskiej było przyłączenie fragmentu fluorenylowego do otrzymanych spirooksazolidyn. Zastosowano procedurę z użyciem fmoc-Cl w obecności węgla potasu w dichlorometanie otrzymując odpowiednie mieszaniny

diastereoizomerów z dobrymi wydajnościami rzędu 70-75%. Podjęte przez Doktoranta próby chromatograficznego rozdzielania diastereoizomerów zakończyły się niepowodzeniem. Doktorant dokonał pełnej interpretacji strukturalnej widm NMR, z rozpoznaniem sygnałów pochodzących od poszczególnych stereoizomerów z użyciem metod spektroskopowych oraz weryfikacji ewentualnego wpływu fragmentu fluorenylu na znakowaną cząsteczkę. Drugi zakres przeprowadzonych badań, obejmował analizę widm absorpcyjnych i emisyjnych otrzymanych fluorescencyjnych produktów. W ramach dalszych badań nad układem fluorenylowym Doktorant otrzymał węglan 9H-fluoren-9-ylometylu prop-2-yn-1-ylu (PK12), a następnie przeprowadził reakcje CuAAC z wybranymi azydkiemi: trans-2-azydocykloheksanolem, azydkiem benzylu, azydkiem tetradecylu, azydoglukozą oraz acylowanymi pochodnymi glukozy i galaktozy, oraz azydotymidyną. Ponadto, dla reakcji 9H-fluoren-9-ylometylu prop-2-yn-1-ylu z azydotymidyną Doktorant przeprowadził optymalizację warunków reakcji z uwzględnieniem doboru rozpuszczalnika i wpływu N-donorowego ligandu AMTC. Przeprowadził także badania trwałości chemicznej otrzymanego barwnika PK12, które wykazały że jest on stabilny w etanolowym roztworze w temperaturach 55 i 65°C przez 3 godziny. Fluorofor w barwniku ulegał degradacji w kwasowym i obojętnym pH, o czym świadczy obniżanie się absorbancji w czasie. W środowisku zasadowym nie zaobserwowano degradacji fluoroforu, lecz zachodzącą hydrolizę łącznika estrowego objawiającą się na widmie punktem izozbestycznym przy długości fali 260 nm. W badaniach biologicznych nad cytotoksycznością barwnika PK12 i produktu jego kondensacji z azydotymidyną PK19 stwierdzono brak znaczącej hepatotoksyczności i neurotoksyczności obu związków.

Kolejnym ważnym osiągnięciem Doktoranta jest opracowanie nowej procedury analizy jakościowej i ilościowej leku przeciwwirusowego azydotymidyny, która polega na derywatywacji azydotymidyny za pomocą alkinowego znacznika PK12 w reakcji CuAAC. Mieszanina reakcyjna zawierająca znakowaną azydotymidynę PK19 była analizowana za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z detekcją UV-VIS lub fluorymetryczną. W ramach przeprowadzonych badań zoptymalizowano znakowanie azydotymidyny w mikroskali w celu analizy ilościowej przy użyciu RP-HPLC z detekcją absorpcyjną i emisyjną. W ramach optymalizacji przeprowadzonego znakowania udało się także stworzyć efektywną metodologię syntetyczną z użyciem liganda AMTC, która pozwoliła znacząco, bo aż 2000-krotnie obniżyć ilość miedzi stosowanej w reakcji CuAAC względem dostępnych danych literaturowych. Uzyskane badania mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań nad oznaczeniem znakowanej azydotymidyny w próbkach biologicznych i śledzenia zmian stężenia tego leku po wprowadzeniu do organizmu.

Modyfikacja barwników Safirinium przez wytworzenie fragmentu azydkowego lub alkinowego w ich strukturze, a następnie wykorzystanie otrzymanych barwników w reakcji kondensacji CuAAC ze związkami o znaczeniu biologicznym, w tym z azydotymidyną stanowi jeden z najważniejszych aspektów przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Chemiczne modyfikacje barwników Safirinium są trudne do zrealizowania ze względu na jonowy charakter tych związków. W badaniach nad barwnikami Safirinium Doktorant usprawnił proces oczyszczania jonowych barwników przez stworzenie nowej metodologii czyszczenia chromatograficznego z użyciem żelu krzemionkowego nasyczonego bromkiem sodu. Mając do dyspozycji efektywną metodę oczyszczania otrzymał 11 nowych pochodnych barwników Safirinium zdolnych do uczestniczenia w reakcjach sprzęgania CuAAC. Doktorant wprowadził do barwników Safirinium fragment propargilowy zawierający wiązanie potrójne otrzymując 7 nowych pochodnych alkinowych. Grupa azydkowa została wprowadzona do trzech barwników Safirinium. Otrzymane w ramach niniejszej pracy alkinowe i azydkowe barwniki Safirinium stanowią istotne poszerzenie dostępnej oferty fluoroforów kompatybilnych w reakcji CuAAC w znakowaniu fluorescencyjnym. Doktorant zaplanował i przeprowadził reakcje katalizowanej miedzią(I) cykloaddycji [3+2] trzech alkinowych pochodnych Safirinium PK20, PK23 i PK24 oraz jednej pochodnej azydkowej PK26 z wybranymi związkami modelowymi. Do syntezy z udziałem alkinowych pochodnych Safirinium Doktorant wybrał azydek tetradecylu (po połączeniu z polarną cząsteczką fluoroforu Safirinium staje się on potencjalnym lipidomimetykiem), azydotymidynę oraz azydkową pochodną tetraacetyloglukozy. Dla azydkowych pochodnych Safirinium Doktorant wybrał modelowy alkin fenyloacetylen, który jest powszechnie stosowany przy badaniach nad efektywnością reakcji CuAAC. W reakcji znakowania azydku tetradecylu dietylowymi fluoroforami Safirinium *P* (PK20) i Safirinium *Q* (PK23) Doktorant otrzymał produkty z zadawalającymi wydajnościami 46% oraz 43%. W przypadku acetylowej pochodnej azydoglukozy wydajności były jeszcze wyższe i wynosiły odpowiednio 91 oraz 81 procent. Produkt reakcji z azydotymidyną zawierał pozostałości azydku, co przełożyło się na relatywnie niską wydajność około 10%. Modelowy fenyloacetylen przereagował z barwnikiem PK24 z zadawalającą wydajnością 51%. Uzyskane wyniki stanowią więc punkt wyjścia do dalszej optymalizacji reakcji, w szczególności dla azydotymidyny oraz lipofilowych związków takich jak azydek tetradecylu i tetraacetyloglukozy.

W ramach pracy syntetycznej Doktorant otrzymał łącznie 33 nowe, nieopisane dotąd w literaturze związki. Oprócz syntezy nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych, najważniejszym osiągnięciem w pracy nad barwnikiem fluorenylowym jest

stworzenie efektywnej analizy ilościowej azydotymidyny metodą chromatograficzną z detekcją absorpcyjną lub emisyjną. W toku badań chromatograficznych stworzył optymalną metodę znakowania azydotymidyny nowym barwinkiem PK12 do analizy ilościowej przy użyciu RP-HPLC z detektorem absorpcyjnym lub emisyjnym. Z kolei, nowo otrzymane azydkowe i alkinowe barwniki Safirinium stanowią alternatywę dla drogich komercyjnie dostępnych barwników mogących znaleźć zastosowanie w reakcji cykloaddycji [3+2] w ramach metodologii click chemistry.

Praca doktorska mgr Patryka Kasza pt. "Synteza nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych oraz znakowanie azydotymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym w ramach koncepcji click chemistry" rodzi kilka refleksji recenzentki:

1) W części obejmującej procedury syntetyczne w opisie końcowego etapu syntezy związków PK13 do PK33 przedstawionej na stronie 101 i 102 rozprawy Doktorant nie określa czasu prowadzonych reakcji, zaznaczając jedynie, że mieszaniny reakcyjne były pozostawione na okres jednej nocy. Czy była przeprowadzona optymalizacja czasu reakcji i czy określono jaki jest optymalny czas do prowadzenia tych reakcji?

2) Doktorant na stronie 60 twierdzi cytując „Analiza widm ^1H NMR otrzymanych produktów wykazała obecność distereoizomerów cis i trans spirooksazolidyn w stosunku prawie równomolowym.” Analiza ta nie jest jednak zawarta w przedstawionej dysertacji. Czy równomolowy stosunek diastereoizomerów był także potwierdzony innymi metodami analitycznymi? Czy na tym etapie syntezy próbowano rozdzielić izomery cis i trans?

Należy podkreślić fakt, że praca doktorska powstała w wyniku realizacji projektu badawczego "Nowe alkinowe pochodne barwników z grupy *Safirinium*: znakowanie fluorescencyjne azydotymidyny w ramach koncepcji *click chemistry*" finansowanego ze środków NCN. Praca doktorska zaowocowała dwoma publikacjami naukowymi w prestiżowych czasopismach, o bardzo wysokim współczynniku IF oraz ważnym zgłoszeniem patentowym.

Reasumując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Patryka Kasza "Synteza nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych oraz znakowanie azydotymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu biologicznym w ramach koncepcji click chemistry" cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę, aktualność i wartość aplikacyjną uzyskanych wyników oraz wartościową dyskusję dowodzącą wiedzy i opanowania tematu przez Doktoranta. Rozprawa doktorska jest napisana piękną polszczyzną, w pięknym stylu. Dysertacja jest dopracowana także pod względem edytorskim, jest wydana w formie książki, co rzadko zdarza się w

przypadku prac doktorskich. Każdy detal tej rozprawy doktorskiej jest przemyślany i dopracowany. Biorąc do ręki tę książkę, czytając ją recenzentka czuje ogromny entuzjazm naukowy, pasję, potencjał naukowy i zaangażowanie zarówno Doktoranta, jak i Jego Promotora Profesora Marka Cegły oraz promotora pomocniczego dr Przemysława Szafrąńskiego.

Rozprawę doktorską oceniam wysoko, uważam za niezwykle interesującą, recenzowanie jej było dla mnie zaszczytem i wielką przyjemnością. Pracę doktorską, z pełnym przekonaniem rekomenduję do wyróżnienia. Stanowi ona samodzielny dorobek naukowy, prezentuje bardzo wysoki poziom, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu, zakres i jakość badań. Oprócz walorów poznawczych praca doktorska mgr Patryka Kasza posiada także wartość aplikacyjną i w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym z późniejszymi poprawkami z 2014r. (Dz.U. Poz. 1852). Z wielką przyjemnością mam zaszczyt przedstawić wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Patryka Kasza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakład Biotechnologii
Anna Bielawska
prof. dr hab. Anna Bielawska