



**Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków
Lecznicych z Pracownia Modelowania Komputerowego**

*Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin,
Tel./fax. 0-81-4487270/4487272*



**Chair and Department of Synthesis and Chemical Technology
of Pharmaceutical Substances with Computer Modeling Lab**

*Faculty of Pharmacy with Division of Medical Analytics
Medical University of Lublin
4A Chodźki str., 20-093 Lublin, Poland
Phone/fax *048-81-4487270/4487272*

Lublin, 25-12-2020

Recenzja rozprawy doktorskiej

Mgr Patryka KASZY

**z Zakładu Chemii Organicznej, Katedry Chemii Organicznej
Wydziału Farmaceutyczny Collegium Medicum,
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

**pt. „Synteza nowych azydkowych i alkinowych znaczników fluorescencyjnych
oraz znakowanie azydotymidyny oraz innych cząsteczek o znaczeniu
biologicznym w ramach koncepcji click chemistry.”**

Wraz z olbrzymim postępowaniem w projektowaniu nowych leków, który zaznaczył się w ostatnich latach, wiele dyscyplin i dziedzin nauki rozwinęło się także. Jako specjalista chemii medycznej, a więc po trosze chemik i farmaceuta zmiany takie obserwuję w diagnostyce medycznej oraz w syntezie. W pierwszej dziedzinie (diagnostyce) wykorzystuje się coraz częściej czułe metody detekcji organelli komórkowych na poziomie mikrostruktur, pozwalające na obserwację dynamicznych transformacji w obrębie struktur submikroskopowych przez łączenie selektywnego wykrywania z np. fluorescencją. W drugiej dziedzinie (synteza) rozwijają się szybkie metody katalizowane przez metale szlachetne lub półszlachetne pozwalające na syntezę nowych wiązań węgiel-węgiel, syntezę przepływowej lub syntezę „click”.

Praca doktorska mgr Kaszy dotyczy badań w obszarze z pogranicza chemii organicznej i biologii molekularnej. Obejmuje syntezę znakowanych fluorescencyjnie

związków (leków, cukrów, lipidomimetyków) oraz badanie ich możliwości wykorzystania. Jako związki bazowe do modyfikacji doktorant wykorzystał azydotymidynę, cukry – pochodne glukozy i galaktozy, oraz azydek tetradecylu. Natomiast jako fluorofor zastosował układ fluorenometylu (Fmoc) oraz barwniki Safirinium.

Praca P. mgr Kaszy przedstawiona do recenzji została skonstruowana według dosyć typowego dla prac farmaceutycznych schematu, łącząc elementy syntetyczne, analityczne i biologiczne. Jest także kolejnym rozwinięciem szerokiego programu badawczego prowadzonego w Katedrze Chemii Organicznej w zespole prof. Marka Cegły.

Projekt przedstawiony w pracy doktorskiej jest nowatorski zarówno ze względu na metodykę syntetyczną jak i możliwości wykorzystania w badaniach komórkowych. Chemizm wykorzystany przez doktoranta w pracy obejmował katalizowaną przez miedź cykloaddycję azydków i alkinów (CuCAAC). Taka cykloaddycja określana jest także jako „chemia zatraskowa” (ang. click-chemistry). Praktyczny aspekt projektu to śledzenie losów azydotymidyny w komórce co pozwala na szeroką analitykę tego leku w materiale biologicznym oraz modyfikacja barwników Safirinium prowadząca do znacznie tańszych, a więc i powszechniej dostępnych nowych połączeń.

Reakcję (CuAAC) zaliczana do szerszej grupy reakcji „tzw. orbitali frontalnych” jest bardzo szeroko stosowana nie tylko w syntezie 1,2,3-triazoli ale także w procesach funkcjonalizacji układów makro, także żywych od poziomu białek po komórki, czy tkanki.

W przeglądzie literatury źródłowej doktorant omówił znaczenie fluorescencji w badaniu układów biologicznych, przedstawił barwniki fluorescencyjne stosowane w tych badaniach oraz sposoby przyłączania barwników do układów biologicznych odgrywających rolę analitów (znakowanie fluorescencyjne). Jedną z takich metod jest cykloaddycja azydków i alkinów, która doktorantów także omówił wyczerpująco w tej części pracy. Ma to swoje istotne uzasadnienie, ponieważ metodę tą doktorant wykorzystał w części chemicznej pracy doktorskiej.

Część eksperymentalna mgr Kaszy podzielona została na dwie części.

Pierwsza objęła badania wybranego barwnika fluorenylowego w celu sprawdzenia efektywnej metodyki znakowania i ilościowej analizy chromatograficznej, ze szczególnym uwzględnieniem analizy ilościowej znakowanej azydotymidyny.

Druga, bazując na wynikach pierwszego etapu, objęła modyfikacje barwników Safirinium w celu wprowadzenia fragmentów azydkowych i alkinowych, umożliwiając ich dalsze łączenie ze strukturami łańcowymi. Wymagało to także opracowania nowych i efektywnych metod oczyszczania otrzymanych pochodnych. W sumie doktorant opisał syntezę 33 całkowicie nowych i nieopisanych produktów końcowych oraz 6 znanych produktów pośrednich. Wszystkie związki zostały kompleksowo scharakteryzowane spektralnie – H i C NMR, IR, MS, Rt. Dwuwymiarowy NMR został także wykorzystany do identyfikacji i kwantyfikacji powstających w kilku reakcjach diastereoizomerów cis i trans. Proporcja izomerów była bliska 1 : 1. Metodyka syntezy, rozdzielenia i oczyszczania jest skrupulatnie opisana i zapewnia wystarczającą ilość informacji dla jej powtórzenia. W opisie związków zaprezentowano w niektórych przypadkach także wyniki analizy elementarnej oraz widma H NMR w różnych rozpuszczalnikach. Czystość otrzymanych połączeń w większości przypadków wynosiła 100%. Tylko w bardzo niewielu była niższa ale nigdy nie spadła poniżej 94%.

Badania uzupełniające służyły określeniu właściwości spektralnych (widma absorpcyjne i emisyjne), trwałości chemicznej (wpływ pH i temperatury) oraz cytotoksyczności. W badaniach chromatograficznych zoptymalizowano proces derywatywacji i analizy azydotymidyny.

Cel, który postawił sobie doktorant, czyli wykorzystanie metodyki CuAAC do wprowadzania znaczników fluorescencyjnych i weryfikacja praktyczna ich użycia został z sukcesem osiągnięty.

Praca jest zaprezentowana w sposób zwięzły i jasny. Zawiera krótki ale bardzo dobrze opracowany wstęp literaturowy, a metodyka wszystkich etapów badawczych, jest także zaprezentowana w sposób wystarczający. Dyskusja obejmuje tylko najważniejsze elementy bez zbędnych dłużyzn, a wnioski uwypuklają najważniejsze ustalenia dyskusji.

Poziom pracy formalnie i merytorycznie jest bardzo wysoki, jednakże chciałbym zwrócić uwagę doktorantowi na kilka problemów, które zauważyłem czytając pracę:

- drobne, ale dosyć powszechne literówki;
- pomyłona numeracja na stronie 42 – powinno być 154-6 a jest 112-4;
- wyznaczanie granic detekcji i oznaczalności w oparciu o tylko trzy punkty (str. 80);

przytaczam jedynie z obowiązku recenzenta, aby przy przygotowaniu publikacji uwagi te można było uwzględnić.

Pomimo przedstawionych wyżej uwag moja ocena rozprawy doktorskiej mgr Patryka Kaszy jest pozytywna ponieważ postawione cele badawcze i poznawcze zostały zrealizowane, a doktorant wykazał się znakomitym opanowaniem warsztatu badawczego i umiejętnością właściwego i skutecznego planowania badań. Uważam, że spełnia ona wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Patryka Kaszy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 2020-12-25

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii
Chemicznej Substancji Leczniczych
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk
profesor zwyczajny