



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ
P. MGR INŻ. DARIUSZA KOZAKIEWICZA, PT. „KATYNON JAKO
BLOK BUDULCOWY I STRUKTURA UPRZYWILEJOWANA W
SYNTEZIE KARBAMINIANÓW, TIOSEMIKARBAZONÓW, 2-(3H)-
OKSAZOLONÓW, 1,4- IZOCHINOLINODIONÓW ORAZ
POCHODNYCH AMINOKWASÓW O SZEROKIM SPEKTRUM
AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ”

Przedłożona do oceny praca doktorska pana mgr inż. Dariusza Kozakiewicza została wykonana w ramach współpracy Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z Firmą DK CHEM Organic Synthesis LTD Sp. K., pod kierownictwem promotora, pana prof. dr hab. inż. Jarosława Polańskiego. Ponadto praca została wzbogacona wynikami skringingu biologicznego prowadzonego w ramach współpracy zagranicznej z zespołem prof. Josefa Jampilka z Uniwersytetu Farmacji i Weterynarii w Brnie (Czechy), a także wynikami modelowania molekularnego przeprowadzonego w ramach współpracy wewnątrzuczelnianej z zespołem prof. Andrzeja Bąka. Doktorant jest współautorem jednej publikacji na łamach prestiżowego czasopisma *International Journal of Molecular Science* (IF>4) oraz dwóch polskich zgłoszeń patentowych, co już na wstępie podkreśla zarówno naukowe, jaki i wdrożeniowe walory obszarów badawczych stanowiących przedmiot jego zainteresowań.

Głównym obiektem zainteresowań naukowych Doktoranta, ujętych w przedstawionej do oceny dysertacji, są związki chemiczne zawierające w strukturze motyw katynonu. Zainteresowanie katynonem jest w pełni uzasadnione w świetle istniejącego stanu wiedzy na temat budowy naturalnych neuroprzekazników, a w konsekwencji rozwoju badań farmaceutycznych, nawiązujących strukturalnie do neurotransmiterów licznych leków pochodzenia naturalnego i syntetycznego, tudzież potencjalnych środków leczniczych w fazie poszukiwań.

Doktorant wyeksponował te kwestie w obszernym - liczącym 50 stron, rozdziale swojej dysertacji pt. „Część literaturowa”, gdzie przytoczył przeszło 30 struktur związków zawierających motyw katynonu lub jego zredukowanej wersji – katyny, które znalazły różnorodne wykorzystanie terapeutyczne: od regulacji ciśnienia krwi i rytmu serca poprzez wpływ na przyrost masy, działania przeciwhistaminowe czy wspomagające leczenie uzależnień, aż po zastosowanie w leczeniu infekcji wywoływanych przez patogenne drobnoustroje. Doktorant starał się tu również wyjaśnić skrótowo mechanizmy działania wybranych leków na poziomie molekularnym, najmocniej akcentując ich wpływ na układ adrenergiczny. Zainteresowanie Doktoranta katynonem, zawierającym układ α -aminoketonu, wynika również z dużej reaktywności chemicznej takiego układu, a co za tym idzie, wykorzystania go w różnorodnych ścieżkach syntezy organicznej, co daje szerokie możliwości projektowania nowych środków leczniczych skierowanych na zróżnicowane molekularne cele terapeutyczne. Doktorant przeanalizował reaktywność α -aminoketonów podając przykłady wykorzystania ich w reakcjach

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

prowadzących do otrzymania układów: izochinolinowych, piroli, pirazyn, aminoalkoholi, czy oksazoli i oksazonów.

W „Części literaturowej” Doktorant poświęca również wiele uwagi innym grupom chemicznym o istotnym znaczeniu terapeutycznym: karbaminianom, tiosemikarbazonom i 1,4-izochinolinodionom, przedstawiając krótką charakterystykę reprezentatywnych połączeń o znaczeniu terapeutycznym. Najobszerniej scharakteryzował grupę karbaminianów, eksponując korzystny wpływ motywu uretanowego na właściwości farmakokinetyczne, w szczególności stabilność, co przekłada się na wykorzystanie karbaminianów jako proleków oraz jako leków, m.in. w leczeniu: jaskry, zakażeń pasożytniczych i bakteryjnych, infekcji wirusowych, czy chorób nowotworowych, takich jak rak piersi, płuc czy chłoniak Hodgkina. W podrozdziale poświęconym pochodnym tiosemikarbazonu przedstawił historię rozwoju tej grupy terapeutycznej zapoczątkowanej odkryciem przeciwgruźliczego tioacetazonu, by następnie omówić potencjał kolejnych przedstawicieli tej grupy w leczeniu ospy (metisazon) oraz innych groźnych chorób tropikalnych o podłożu wirusowym, bakteryjnym, grzybiczym czy pasożytniczym.

W charakterystyce oksazonów podkreślił ich możliwości terapeutyczne związane z aktywnością: neurotropową, kardi toniczną, przeciwbólową i przeciwzapalną czy przeciwnowotworową. W przypadku 1,4-izochinolinodionów omówił zaś działania: przeciwwirusowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, a także przeciwpadaczkowe czy hamujące istotne z fizjologicznego i patofizjologicznego punktu widzenia enzymy: fosfodiesterazy, kaspazy czy deacetylazy histonów, wskazując na wszechstronne możliwości terapeutyczne tej grupy heterocyklicznych połączeń.

W bogatej charakterystyce rozważanych grup połączeń Doktorant zwraca również uwagę na pewne ograniczenia w ich zastosowaniu terapeutycznym, spowodowane działaniami niepożądanymi, tym samym wskazując na celowość dalszych modyfikacji chemicznych w poszukiwaniu struktur o wyższym bezpieczeństwie i korzystniejszym ogólnym profilu farmaceutycznym.

Ten najbogatszy pod względem literaturowym rozdział pracy zamyka podrozdział dedykowany nowej koncepcji koniugacji peptydów z pochodnymi katynonu w celu uzyskania nowych terapeutyków, skierowanych przeciw tak istotnym wyzwaniom współczesnej medycyny, jak choroby autoimmunizacyjne, alergiczne, czy choroby ekogenetyczne, o wyszukany, a w wielu przypadkach niezidentyfikowanym punkcie uchwytu, sugerującym jednak udział specyficznych białek, np. białek strukturalnych wirusów.

Na moje duże uznanie zasługuje dogłębna analiza literatury z zakresu medycyny i biologii molekularnej, którą przeprowadził Doktorant, aby wysnuć ciekawe przypuszczenia odnośnie potencjalnego wykorzystania syntezy białka w oparciu o projektowanie prognozujące jego właściwości. Odnosił się m. in. do hipotezy indukowania chorób autoimmunizacyjnych przez białka strukturalne wirusów na drodze mimikry molekularnej czy mutacji w obszarach DNA związanych z biosyntezą białkowych immunomodulatorów (cytokin).

Doktorant opracował ten rozdział w oparciu o 113 pozycji literaturowych w tym w zdecydowanej przewadze (88) pochodzących z piśmiennictwa i patentów XXI wieku,



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

zaś pozyskane z nich informacje, dobrze korespondują z podjętymi przez Doktoranta zadaniami badawczymi, zarówno pod względem tematycznym, jak i proporcji objętościowych. Taką obserwację można poczynić po przeczytaniu kolejnego rozdziału pracy pt. „Badania własne”, albowiem w pracy brakuje rozdziału, który spajałby przegląd literaturowy z opisem badań własnych Doktoranta. Co prawda na samym początku dysertacji pojawia się jednostronicowy rozdział pt. „Założenia i cel pracy”, ale ani jego topologia, ani zbyt lakoniczne i niejednoznaczne informacje nie oddają celu, założeń i zakresu prac zaplanowanych przez Doktoranta. Rozdział ten jest zredagowany trochę niefortunnie – wynika z niego, że zakres pracy jest szczególnym przypadkiem jej celu, przy czym tak jedno, jak i drugie wymagałoby sprecyzowania. Ponadto Doktorant stosuje tu skrót, którego nie wyjaśnia (PS), oraz odwołuje się do „związku 1”, który nie został przedstawiony (prawdopodobnie chodzi o katynon podpisany jako „wzór 1”).

O konkretnych zadaniach badawczych Doktoranta podpartych dodatkowym przeglądem literaturowym metod stosownych syntez chemicznych, a także o związanych z nimi problemach oraz uzyskanych wynikach można dowiedzieć się z rozdziału „Badania własne”. Na podstawie tego rozdziału wysoko oceniam pokaźną ilość przeprowadzonych prac syntezy organicznej, które stanowią sedno całego doktoratu. Składa się nań: seria 4-etapowych reakcji, służących otrzymaniu 41 finalnych pochodnych katynonu z ugrupowaniem karbaminianów – głównego przedmiotu badań Doktoranta, następnie 4-etapowe syntezy 14 tiosemikarbazonów, ponadto synteza pięciu pochodnych 2-(3H)-oksazolonów, i pięciu 1,4-izochinolonodionów, a także próba syntezy pochodnych katynonów z ugrupowaniem karboksylowym.

W ramach głównego kierunku - modyfikacji chemicznych katynonu, Doktorant przeanalizował zalecane literaturowo metody syntezy karbaminianów, decydując się na wybór reakcji chloromrówczanów z aminami. Syntezę przeprowadził wykorzystując kolejno acylację metodą Friedla-Craftsa, bromowanie przy węglu w pozycji α , by następnie użyć otrzymane bromopochodne do alkilowania odpowiednio podstawionych amin I-rzędowych, które stanowiły półprodukt dla reakcji z chloromrówczanami: alkilowymi, aryłowymi bądź benzyłowymi w celu uzyskania finalnych karbaminianów. Na uznanie zasługują wysokie wydajności otrzymanych produktów, co świadczy o znaczącej ekspertyzie Doktoranta w syntezie organicznej, zwłaszcza biorąc pod uwagę wykorzystanie raczej trudnych metod syntezy i oczyszczania produktów (reakcje Friedla-Craftsa, bromowanie, rozdział chromatograficzny). Otrzymana seria okazała się również dużym sukcesem pod względem aktywności farmakologicznej skierowanej na hamowanie cholinioesteraz: butyrylo- (BuChE) i acetylocholinoesterazy (AChE). Czternaście, spośród otrzymanych związków, wykazało zdecydowanie wyższą aktywność inhibitora BuChE niż referencyjny inhibitor rywastygmina, dwa- wyższą lub porównywalną do donepezilu, a większość zdecydowanie wyższą selektywność działania na BuChE w odniesieniu do AChE niż galantamina i pozostałe wymienione leki referencyjne. Otrzymana grupa połączeń wraz z wynikami skringu cholinioesterazowego, została również wykorzystana do przeprowadzenia analizy QSAR nowatorską metodą CoMSA-IVE-PLS, opracowaną w ostatnich latach przez Prof. J. Polańskiego we współpracy z Prof. A. Bakiem.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Wysokie walory naukowe reprezentują również badania własne Doktoranta, dotyczące syntezy zaplanowanych pochodnych tiosemikarbazonów. Mimo, że pracochłonne 4-etapowe syntezy nie przyniosły pożądanych produktów, nieoczekiwane wyniki spektroskopii masowej i NMR związków finalnych skłoniły go do interesującej dyskusji w poszukiwaniu rzeczywistej struktury otrzymanych związków. Dogłębna analiza przypuszczalnych ścieżek reakcji oraz charakterystyka spektroskopowa potencjalnych produktów, podparta danymi literaturowymi, stanowią cenny wkład w rozwój wiedzy na temat szlaków chemicznych w procesie kondensacji związków karbonylowych z tiosemikarbazydami w zależności od podstawienia użytych reagentów.

Kolejnym ważnym wkładem w rozwój polskiej i światowej chemii organicznej jest opracowana w ramach tej dysertacji autorska modyfikacja metody Bischlera-Napieralskiego w celu otrzymania pochodnych tetrahydroizochinoliny.

Wymienione osiągnięcia nie umniejszają znaczenia pozostałych wątków badań własnych, czyli otrzymania nowych oryginalnych pochodnych 2-(3H)-oksazolonów oraz „kilku pochodnych karboksylowych katynonów”, choć w przypadku tych drugich trudno ocenić rangę przeprowadzonego badania na podstawie zbyt zdawkowych informacji, a weryfikacją znaczenia tych pierwszych będą wyniki biologicznego skriningu, który obiecał Doktorant zarówno w rozdziale „Badania Własne”, jak i w następującym po nim „Podsumowaniu”.

Ostatnim rozdziałem pracy jest licząca sobie 75 stron część eksperymentalna zawierająca procedury przeprowadzonych syntez oraz charakterystykę większości otrzymanych związków. Szkoda, że zabrakło w niej procedur przeprowadzonego skriningu farmakologicznego. Uzyskane wyniki hamowania cholinoesteraz przez badane karbaminiany były analizowane w porównaniu do danych literaturowych (na końcu dyskusji widnieje odnośnik 122) dla rywastygminy, donepezilu i galantaminy. **Jestem ciekawa, czy związki referencyjne były testowane tą samą metodą, co karbaminiany.** Jest to ważne, ponieważ literatura podaje diametralne różnice wartości IC_{50} aktywności hamowania AChE i BuChE przez te leki, w zależności od użytej metody i w zasadzie powinno się porównywać tylko wyniki w obrębie tego samego testu. Mam prośbę, aby Doktorant odpowiedział mi na to pytanie w trakcie obrony.

W końcowej części Dysertacji zamieszczony jest dwustronicowy życiorys naukowy Doktoranta oraz „Bibliografia”, obejmująca łącznie 151 pozycji literaturowych, które oprócz omówionego szczegółowo rozdziału „Część literaturowa” wzbogacają również rozważania naukowe prowadzone w ramach „Badań własnych” oraz dane eksperymentalne.

Jestem pełna uznania dla strony merytorycznej przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej ze względu na niewątpliwe wartości naukowe, ekspertyzę Doktoranta w prowadzeniu różnorodnych, nierzadko bardzo ambitnych syntez, dogłębną analizę uzyskanych wyników, a także szerokie horyzonty teoretyczne w aspekcie działań farmakologicznych grup chemicznych będących punktem jego zainteresowań.

Z pewną krytyką muszę się jednak odnieść do umiejętności redakcyjnych p. mgr inż. Kozakiewicza, w tym również staranności i dokładności w opracowaniu i przedstawieniu wyników badań. Do uwag, które wyraziłam uprzednio odnośnie

Wydział Farmaceutyczny

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

rozdziału „Założenia i cel pracy” dołączam kolejną, dotyczącą niejasnych retrospekcji w opisach, które wywołują zamieszanie i zaskoczenie. Bardziej szczegółowe uwagi przedstawiam poniżej:



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

1. Przykłady retrospekcji i zawiłanych informacji:

- Na stronie 51, Doktorant pisze:

„Przedstawiona w niniejszej pracy metoda syntezy 1,4-izochinolinodionów opartej na reakcji Bischlera-Napieralskiego pochodnych karbaminianowych 2-amino 1-fenylopropan-1-onu nie była nigdy wcześniej opisywana w literaturze. Ty samym uzupełnia to kompendium wiedzy o strukturze 1,4-izochinolinodionów, zwłaszcza, że w literaturze nie znajdziemy wiele informacji na ich temat”.

Pierwsza wzmianka o tej metodzie (opracowanej przez Doktoranta) pojawia się, zaś, dopiero na stronie 109 (w rozdziale „Badania własne”)

Wydział Farmaceutyczny

- Na stronie 52 Doktorant wspomina o zjawisku mimikry molekularnej, a tłumaczy to pojęcie dopiero 27 wersów dalej (strona 53), gdy pojęcie pojawia się po raz drugi.

Katedra Technologii

- Zaskakujący był dla mnie również następujący opis (str 62):

i Biotechnologii

„Z farmakologicznego punktu widzenia wartości logP pokrywają stosunkowo szeroką domenę zmienności tego parametru. Z syntetycznego punktu widzenia związki takie powinny charakteryzować się dobrą biodostępnością”.

Środków Leczniczych

Chciałabym, żeby Doktorant objaśnił mnie, co miał tu na myśli.

2. Brak wytłumaczenia używanych pojęć i skrótów, np. wspomniany skrót „PS” dotyczący struktur uprzywilejowanych (prawdopodobnie z angielskiego „privileged structure”).

3. W opracowaniu naukowym, jakim jest dysertacja doktorska, elementy graficzne (ryciny, schematy, wykresy) powinny mieć numerację i podpisy (umieszczone poniżej). Tabele powinny mieć tytuły (u góry), a pod spodem objaśnienia, np. jeśli w Tabeli 1 (str. 24) Doktorant wytłuszczył fragment struktury i powinien pod tabelą zamieścić objaśnienie tego zabiegu, podobnie w Tabeli 4 – odnośnie danych podanych na czerwono. Doktorant nie uwzględnił tego w swojej dysertacji.

4. W pracach opisujących syntezy chemiczne, wszystkie występujące struktury powinny mieć odrębną sygnaturę (numer lub symbol literowy). Występujące na schematach podstawniki „R”, „X”, itp. powinny być objaśnione (informacja, co się pod nimi kryje). Doktorant nie uwzględnił tego w swojej dysertacji.

ul. Medyczna 9

5. Błędy gramatyczne i stylistyczne:

PL 30-688 Kraków

- str.10 – dziwne zdanie „Katynon wykazujący powinowactwo do układu nerwowego, który reguluje wszystkimi procesami życiowymi może okazać się szczególnie interesujący.”

tel. +48 12 620 55 80

– tytuły podrozdziałów: 2.2.1.1., 3.4.1. oraz 5.4.

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

- str. 14 -zdanie bez orzeczenia: „Stosowane najczęściej jako leki kardiologiczne lub zmniejszające ukrwienie błon śluzowych w stanach zapalnych.”
- str. 32 – „Obecność grupy karbonylowej nadaje właściwości kwasowe atomowi węgla α , sąsiadującego z karbonylowym atomem węgla”
- str. 44 – „Zdolność kompleksowania żelaza przez połączenia TSC z morfoliną i piperazyną mogą stworzyć nowe trendy w terapii przeciwnowotworowych”
- str. 44 – „Wszechstronne właściwości farmakologiczne kolejnych kompleksów TSC przedstawił rumuńsko-mołdawski zespół, który opracował ich charakter biologiczny z miedzią, wanadem oraz niklem wobec bakterii i grzybów”
- str. 44 - Obecnie głównym problemem uniemożliwiającym powszechne zastosowanie kliniczne pochodnych tiosemikarbazonów mimo obiecujących aktywności biologicznych to wysoka cytotoksyczność otrzymanych związków”

Wydział Farmaceutyczny

6. Błędy ortograficzne i interpunkcyjne

- str. 13 - błąd w pisowni typów receptorów adrenergicznych „ α -1 i α -2”
- liczne błędy i niekonsekwencje w pisowni wyrazów razem lub oddzielnie, najczęściej przymiotników i przysłówków z „nie”. Przykładowo: str. 53- „u których zastosowano nie właściwie antybiotykoterapię, lub nadużywających leków objawowych w pozornie nie groźnych infekcjach”, str. 78: „karbaminiany, które po przez mechanizm karbamylacji esteraz dezaktywują te enzymy”, strona 15 – „przeciw astmatyczne”

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

7. Braki i niedociągnięcia w rysunkach, schematach i części eksperymentalnej:

- Schemat 5 (str. 61) - błąd w strukturach finalnych karbaminianów (brakuje tlenu)
- rażą niestaranne rysunki struktur chemicznych, w różnej wielkości i zróżnicowanej proporcji długości wiązań do symboli (np. str. 32, str. 33, , str. 47 itd.)
- strona 109 – odwołanie do schematu 13 (powinno być 12)
- brak jednostki (Hz) przy stałych sprzężenia (str. 131, 160, 161, 168)
- str. 194 i 195 - przy widmach ^{13}C -NMR widnieje słowo „dopisać”

Czytając pracę nasunęły mi się jeszcze następujące pytania do Doktoranta:

1. Doktorant podaje wysoką wydajność półproduktów (rozdz. 5.3.1.1. – 5.3.1.11).

Jaka była ich czystość?

2. Otrzymane w pracy tiosemikarbazony zostały przekazane na badania biologiczne (rozdz. 3.2.4). Pod kątem jakiej aktywności są badane te związki? Być może są już znane wyniki tych testów i Doktorant mógłby je skomentować.

Przytoczone niedociągnięcia dotyczą głównie formy, a nie treści doktoratu. Stąd nie obniżają mojej ogólnie pozytywnej opinii na temat przedstawionej do oceny dysertacji, a w szczególności wysokiej ekspertyzy Doktoranta w obszarze chemii organicznej skierowanej na projektowanie i syntezę nowych związków o aktywności farmakologicznej. Wierzę, że moje uwagi ułatwią Doktorantowi samodzielne przygotowywanie publikacji, czego zdaje się nie ma jeszcze na koncie swojej aktywności naukowej.

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl

Reasumując, praca doktorska p. mgr inż. Dariusza Kozakiewicza reprezentuje interesujące aspekty badawcze, wysoki poziom w obszarze chemicznej syntezy organicznej, a także stawia czoła ważnym wyzwaniom chemii medycznej w poszukiwaniu nowych skutecznych środków leczniczych. Doktorant spełnia, zatem, kryteria osoby ubiegającej się o stopień doktora nauk chemicznych.



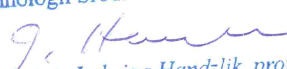
UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie pana magistra inżyniera Dariusza Kozakiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 20 listopada 2019

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Technologii
i Biotechnologii Środków Leczniczych UJ CM


dr hab. inż. Jadwiga Handzlik, prof. UJ
p.o. kierownik

Katedra Technologii

i Biotechnologii

Środków Leczniczych

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 55 80

fax +48 12 620 55 96

j.handzlik@uj.edu.pl

www.farmacja.cm-uj.krakow.pl