

OCENA

rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk farmaceutycznych **mgr farm. Mateusza Rezlera**
pt. „*Synteza, analiza struktury i ocena aktywności biologicznej nowych diamidyn aromatycznych*”.

Promotor: **prof. dr hab. Dorota Maciejewska**

Badania naukowe skierowane na poszukiwanie nowych leków oraz sposobów ich syntezy stanowią bardzo istotny fragment współczesnej chemii organicznej oraz medycznej, są one przedmiotem nieustannego i szczególnego zainteresowania nie tylko nauki akademickiej, ale również przemysłu. Poszukiwanie rozwiązań praktycznych wykorzystywanych we współczesnej chemii jest nierozłącznie związane z dogłębnym zrozumieniem podstaw teoretycznych realizowanych procesów, wśród których jedno z najważniejszych miejsc zajmuje zrozumienie mechanizmów oddziaływania: związek aktywny – cel molekularny. To właśnie szczegółowa wiedza o zależności: struktura chemiczna a aktywność biologiczna jest podstawą racjonalnego projektowania nowych bardziej skutecznych, a zarazem mniej toksycznych leków. Z drugiej strony opracowanie prostych metod syntetycznych, dających dostęp do takich aktywnych farmaceutycznie cząsteczek, ma wymierny wpływ na koszt i łatwość otrzymywania pożądaných produktów i pozwala ułatwić wejście nowych leków na rynek.

Jak wskazuje tytuł, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest dedykowana poszerzeniu stanu wiedzy o zależności struktura a aktywność w szeregu diamidyn aromatycznych, związków potencjalnie aktywnych względem grzyba *Pneumocystis jiroveci* wywołującego pneumocystozowe zapalenie płuc.

Mimo swej względnej niegroźności dla osób zdrowych, w przypadkach upośledzenia odporności, między innymi u chorych na AIDS, choroby nowotworowe lub leczonych immunosupresyjnie, *Pneumocystis jiroveci* jest bardzo niebezpieczny i może wywoływać pneumocystozowe zapalenie płuc. Leczenie pneumocystozy zazwyczaj uwzględnia podawanie antybiotyków o szerokim spektrum działania np. sulfametoksazolu, hamującym biosyntezę kwasu dihydrofoliowego, w połączeniu z inhibitorem reduktazy kwasu

dihydrofoliowego np. trimetoprymem. W przypadku wrażliwości pacjentów na sulfametoksazol stosowane są sulfadoksyna, pirymetamina, prymachina oraz pentamidyna jak również kilka innych leków. W ten czas gdy mechanizm działania preparatów sulfamidowych jest dobrze rozpoznany, wyjaśnienie właściwości biologicznych pentamidyny budzi ciągle zainteresowanie wśród badaczy. Zainteresowanie tym preparatem można również zrozumieć, gdy weźmiemy pod uwagę jego aktywność w leczeniu innych groźnych chorób zakaźnych takich jak leiszmanioza, babeszjoza oraz trypanosomoza afrykańska, które są wywoływane innymi patogenicznymi drobnoustrojami. Nie bez znaczenia jest też fakt, że mimo swojej skuteczności, stosowanie pentamidyny może mieć poważne negatywne skutki uboczne. W świetle wspomnianego powyżej, wydaje się bardzo zasadnym podjęcie prób poszukiwania nowych (bardziej skutecznych) pochodnych pentamidyny oraz wyjaśnienia mechanizmu ich działania. Właśnie tego wyzwania podejmuje się Autor, mgr. Mateusz Rezler, stosując ogólnie przyjęty algorytm: projektowanie nowych związków na podstawie analizy literatury; synteza wybranych związków modelowych; analiza ich struktury i aktywności biologicznej; próby stworzenia modelu oddziaływań i odnalezienia celu molekularnego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została podzielona na 8 logicznie komponujących się rozdziałów z których 5 pierwszych: *wprowadzenie i cel pracy, przegląd bibliografii, materiały i metody, wyniki i dyskusja* oraz *wnioski* zawierają treści merytoryczne; rozdział 6, *załączone publikacje*, przedstawia zbiór publikacji Autora, w tym 2, opublikowane w cenionych recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, ściśle dotyczą tematyki rozprawy; natomiast rozdziały 7, *indeksy i spisy* zawierają wykazy skrótów: rysunków, tabel oraz równań; a rozdział 8, *bibliografia*, zawierająca 200 pozycji literaturowych. Tak obszerna, w swojej naturze treści, Autor zamknął w 300 stronicowym wydruku komputerowym o istotniej wadze naukowej wykazując się przy tym starannością oraz zwracając należytą uwagę na szczegóły, zarówno merytoryczne, tak i formalne tudzież edytorskie. Rozprawa otwiera się streszczeniem napisanym w dwóch wersjach językowych, a przedstawione na zakończeniu rozprawy wnioski (oraz najbardziej istotne konkluzji, domykające poszczególne rozdziały) mają charakter ogólny i wystarczająco uzasadniony.

Rozprawa ustrukturyzowana w sposób logiczny, a umieszczone na początku każdego rozdziału wprowadzenia, wyjaśniające treści merytoryczne rozdziału i sposoby ich przedstawienia ułatwiają czytanie rozprawy.

1. W otwierającym zatytułowaną „WPROWADZENIE I CEL PRACY” rozprawy tekście Autor określił, że uznaje on nadrzędnym celem dysertacji „poszerzenie bazy diamidyn o znanej aktywności anty-*Pneumocystis* o nowe związki oraz analizę zależności pomiędzy wprowadzonymi modyfikacjami a aktywnością biologiczną”. W tym kontekście przyznać należy, że, z jednej strony, istnieje niekóre zapotrzebowanie na wprowadzenie do praktyki klinicznej nowych analogów pentamidyny, ale z drugiej, niszowość rynku leków na te choroby zmniejsza zainteresowanie dużych koncernów farmaceutycznych badaniami w kierunku opracowania takich leków. Dla tego z całą pewnością zaproponowanie przez Autora uzasadnienie wyboru tematyki badań jest zasadne.

2. Następny rozdział „PRZEGLĄD BIBLIOGRAFII” stanowi mający 96 stron druku tekst zawiera dogłębną analizę rozpatrywanego wyzwania (racjonalne zaprojektowanie, synteza oraz ewaluacja właściwości nowych analogów pentamidyny), zaczynając od podstawowej etiologii pneumocytozy oraz historii odkrycia i podstaw nazewnictwa rodzaju *Pneumocystis*, do którego między innymi należy gatunki *P. carinii* tudzież *P. jirovecii*, jak również niektórych zagadnień natury genetycznej, konsekwencji których uzasadniają działanie pentamidyny na badane grzyby i ich odporność na inne leki. Autor określił okoliczności uwarunkowujące podatność na zachorowanie pneumocytozą oraz wskazał na grupę osób stosujących immunosupresję, w której najczęściej są rejestrowane przypadki zakażenia. Zostały również wymienione główne drogi zakażenia, strategii leczenia, profilaktyki, oraz mechanizm działania pentamidyny i sposoby uodpornienia patogenu na znane substancji lecznicze. Taka szeroka perspektywa, już na samym początku zapoznania się z przedstawioną rozprawą, sprawia pozytywnie wrażenia i umacnia przekonanie, że Autor posiada głęboką i bardzo rozległą wiedzę w zakresie badanego tematu.

Po omówieniu zagadnienia aktywności biologicznej diamidym, Autor opisuje główne metody ich syntezy. Przedstawiony wykaz publikacji, w których przedstawiono syntezę grup amidynowych, naturalnie nie jest kompletny, co znajduje proste wyjaśnienie w dużej ilości doniesień naukowych oraz patentów, dotyczących syntezy amidym, również o zastosowaniu medycznym (np. lek Dabigatran, Nafamostat i wiele innych). Dla tego należy przyznać, że Autorowi dobrze się udało przeprowadzić odpowiednią selekcję i przedstawić tylko badanie najbardziej reprezentacyjne i istotne w kontekście prowadzonych badań własnych.

Pewnym mankamentem, natury technicznej, jest upodobanie Autora do wykorzystania dużej ilości jedno-, dwu- oraz trzy-literowych skrótów. W tym kontekście kluczowym do rozumienia rozprawy jest załączony na końcu *indeks skrótów*.

Podobnie, wątpliwości budzi zasadność kodowania wzorów cząsteczek skrótami literowymi, które zdecydowanie wprowadzają więcej zamieszania, aniżeli uproszczają wyjaśnienie treści merytorycznych. Przykładowo, Autor osobnie wprowadza kod "Z" dla "elementu centralnego" będącego częścią "łącznika = Ł", należącego do "rdzenia = Rd", a następnie wykorzystuje oznaczenie "Z" dla określenia trzech ugrupowań CH w układzie jednego fenylenu (np. str. 51, 80 oraz innych). W innym przykładzie, podanym na tej samej stronie, cząsteczka wcale nie posiada "elementu centralnego". Także Autor wprowadza kod "Am" dla grupy amidynowej, ale rzadko go stosuje na korzyść wykorzystania klasycznej koncepcji przedstawienia wzorów chemicznych. Na szczęście prawie pod wszystkimi wzorami Autor umieszcza tabeli, w których określa wartości przepisane poszczególnym kodem: Z = CH; X = O; Y = O, co wyjaśnia sprawę.

Innym problemem, również natury technicznej, jest omyłkowe wykorzystanie przez Autora skrótu "Ph" (zastrzeżony wyłącznie dla oznaczenia podstawnika C₆H₅) dla oznaczenia grupy fenylenowej C₆H₄ (np. str. 49, 64). Podobnie, niepoprawnie wykorzystane są oznaczenia "Pr", "Py" oraz, nie znane mnie skróty, "Pp", "Hm" lub inne, występujące w kolejnych częściach rozprawy (np. str. 59: Dc, Dd, ^cPe, ^{1,4}Pp, etc, etc...). Takie nazewnictwo nie jest ogólnie przyjęte w chemii organicznej. W wymienionych przykładach powinno korzystać z rekomendacji IUPAC oraz, w miarę możliwości, podawać wzory strukturalne. Inne nietypowe skróty (np. DMFDA, DMADA, etc) są używane w rozprawie w zaledwie kilku miejscach, a więc w tych przypadkach nie było wcale potrzeby wprowadzenia jakiegokolwiek skrótu. Niezasadnym również jest wprowadzenie skrótu „Pp(bezw.)” (str. 124), który Autor stosuje kilka razy: taki skrót nic nie skraca, ale jedynie wprowadza niepotrzebne zamieszanie w narrację rozprawy.

Prawdopodobnie, w intencji sformalizowania sposobu przedstawienia wyników literaturowych, Autor wprowadza do rozprawy proste wzory matematyczne (np. str. 49). Jednak łatwiej byłoby zrozumieć treść, jeśliby Autor umieścił tekście wyjaśnienie twierdzące np., że wartość "W" jest różnicą pomiędzy liczbą komórek w próbie po zakończeniu eksperymentu oraz liczbą komórek w próbie na początku tego eksperymentu. Równania 2.10, wyjaśniające natomiast czym jest procent wzrostu liczby komórek, znajdują się na dalszych stronach rozprawy po tym jak już wprowadzono wskaźnik "W". Również sens współczynnika

selektywności "WS" należałoby wyjaśnić przy jego pierwszym wspomnieniu na stronie 48, wtedy gdy odpowiednia definicja matematyczna tego pojęcia pojawia się dopiero na stronie 54.

Chociaż związki A74, A94, A95, A97 jeszcze nie zostały zaprezentowane w tekście, Tabela 2.8 zawiera dane ewaluacji tych substancji. Co więcej "odszyfrowanie" struktur chemicznych wspomnianych związków, wykorzystując jedynie dane podane w tabeli, nie jest zadaniem trywialnym, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że Autor stosował w tej tabeli dość nietypowe skróty literowe: np. "Hm". Zdecydowanie należałoby wcześniej podać schematy reakcji prowadzących do tych związków. A wyjaśnienie znaczenia parametru „WS”, występującego w tej tabeli pojawia się w rozprawie znacznie później. Struktura rozdziału 2.3.3.3, w którym zostały wprowadzone związki o numerach wykraczających poza zwyczajną kolejność: A34 a następnie A52, A 74, A94, A95, A97; oraz w którym został wspomniany, ale nie wyjaśniony, współczynnik selektywności „WS”, sprawia wrażenie że rozdział ten był planowany do umieszczenia w innym miejscu rozprawy i został przesunięty w ostatniej chwili bez należytej korekty dokumentu.

Za nie do końca trafione można też uznać niektóre sformułowania oraz skróty myślowe użyte przez Autora, które jednak nie zmniejszą wartości merytorycznej pracy:

str. 50 *"...reakcji tego samego typu, ale odpowiadające sobie bloki budulcowe pełniły odwrotne funkcje."* Czyli jakie?

str. 64 *"... różnych dichlorków diacylu dwoma molami chlorowodoru 3- lub 4-aminobenzamidyny. Raportowano satysfakcjonujące wydajności (40-50%) pomimo obecności dodatnio naładowanej grupy amidynowej w pozycji para, silnie obniżającej nukleofilowość..."* Ponieważ reakcja jest przeprowadzana w obecności mocnych organicznych zasad, grupy amidynowe zostaną przeprowadzone w formę nienaładowaną o podobnej do nitryli nukleofilowości.

str. 65 *"... stosując mniej pracochłonną jednoetapową syntezę SP."* Biorąc pod uwagę konieczność wcześniejszego wytworzenia wyjściowej aminobenzamidyny ilość etapów dla obydwu podejść SP oraz SK oraz ich pracochłonność jest podobna.

str. 93 *"Oznacza to, że rdzeń tych diamidyn składa się z części Ar, X, Y połączonych w całość."* Nie jasno co dokładnie i z czym zostało połączone.

str. 93 *"...heterocykliczne pochodne 9H-fluorenu..."* Fluorenu nie jest związkiem heterocyklicznym oraz nie jest związkiem wyjściowym w syntezie tych heterocykli.

str. 100 *"...centralny atom siarki utleniono tymczasowo do sulfotlenku."* Co oznacza "tymczasowo" i dla czego ten atom jest "centralny"?

str. 104 "...grupy z byłą strukturą wiodącą, zastąpioną przez aktywniejszy analog." Nie jest jasno co to oznacza.

str. 77 "furan-2,4-yl". Powinno być -diyl.

str. 103 "grupy anilidowe". Co wchodzi w skład takiej grupy?

Skoro Autor omawia różne podejścia syntetyczne prowadzące do analogów pentamidyny, to na przedstawianych schematach reakcji, dla lepszej przejrzystości narracji, należałoby umieścić wydajności oraz warunki, w których one były uzyskane. Przykładowo w rozdziale 2.3.6.1 wydajności syntezy otrzymywanych amidyn są podane jedynie w tekście, przy okazji omówienia sposobów ich syntezy, wtedy jak Rysunek 2.46 z łatwością pozwala na odpowiednie uzupełnienie. Niestety w przypadku niektórych innych rozdziałów sytuacja jest jeszcze mniej korzystna: tak przykładowo w rozdziale 2.3.8.1 (i następnych) wydajności otrzymywanych związków nie są podawane wcale. Uniemożliwia to ocenę skuteczności przedstawionych metod syntezy.

Dodatkowego wyjaśnienia potrzebuje wniosek Autora na stronie 66, iż za strukturę wiodącą wybrano związek A85. Dla czego nie A149, który również jest znacząco skuteczniejszy od A1?

Na stronie 69, Autor deklaruje że związek A98 "został utworzony z zastosowaniem strategii SP metodą Pinnera". Choć z kontekstu można zrozumieć, że metoda Pinnera został otrzymany wyjściowy związek, który następnie był wykorzystany w syntezie A98, prowadzonej zgodnie ze strategią początkowego otrzymywania grupy amidynowej (SP), należałoby jednak nie wykorzystywać tak skomplikowanych skrótów myślowych, tym bardziej że wcześniej, np. na stronie 47, Autor użył podobnego określenia dla strategii SK – "wykorzystano strategię SK metodą Pinnera" i w tym przypadku reakcją Pinnera faktycznie prowadziła do utworzenia pożądanego amidyn na etapie "końcowego otrzymywania grupy amidynowej (SK)".

Przegląd literaturowy wykazał, że wiele substancji o badanej ogólnej strukturze są bardziej aktywni a zarazem mniej toksyczni aniżeli pentamidyna, oraz że żadna z nich nie weszła do praktyki leczniczych. Niestety często trudno jest porównać aktywności tych związków, gdyż autorzy poszczególnych oryginalnych publikacji naukowych używali różne kryteria sprawdzenia aktywności, a nawet różne dawki w obrębie jednej pracy, jak to jest pokazane np. w tabelach 2.20, 2.21. Zgodnie z deklaracją Autora rozprawy, nie ma możliwości ujednolicenia tych danych literaturowych. Z drugiej strony, stwierdzono, że jedynie nieliczne z tych związków (np. A99) zostały poddane badaniom klinicznym. Próba wyjaśnienia tej sprzeczności, jeżeliby była podjęta przez Autora, mogłaby być wagowym dodatkiem do

rozprawy. Niewspółmierność kryteriów, na podstawie których została przeanalizowana aktywność substancji, czasami rzutuje na wiarygodność wyciągniętych wniosków. Przykładowo w rozdziale 2.3.8 Autor dochodzi do wniosku, że zamiana łącznika pentamidyny na furan-diył jest modyfikacją zwiększającą AAP i obniżającą OP, ale już w rozdziale 2.3.10 Autor stwierdza, że wprowadzenie pierścienia furanowego zamiast grupy $(\text{CH}_2)_4$ jest niekorzystne ze względu na AAP i OT. Ta rozbieżność wskazuje na możliwy brak możliwości odnalezienia ogólnych zależności struktura-właściwości nawet dla związków o podobnej strukturze jakimi są, wg Autora i pod warunkiem *"Jeżeli atom azotu w pierścieniu 1H-benzimidazolu potraktuje się jako odpowiednik atomu tlenu pentamidyny, to związkiem najbardziej przypominającym kontrolę dodatnią jest diamidyna A135"*, związki A1, A135 i A140. Co z kolei podważa wiarygodność pobudowanych diagramów SAR.

Część literaturowa kończy się szczegółowym podsumowaniem obecnego stanu wiedzy, w którym Autor nie tylko wskazał aktywniejsze modyfikacje pentamidyny, ale zrobił 4 praktyczne wskazówki co do modyfikacji korzystnych oraz 9 co do modyfikacji niekorzystnych. Pytanie jednak budzi fakt, że, skoro struktura A29 okazała się być wiodącą, to dlaczego Autor stwierdza że wprowadzenie wiązania $\text{C}=\text{C}$ w części Z (wskazówka #7) jest niekorzystną?

Podsumowując uwagi do części literaturowej można z przekonaniem stwierdzić, że bardzo bogata literatura w tematyce rozprawy została metodycznie i szczegółowo przeanalizowana, a wyniki tej imponującej analizy posłużyły do zrobienia stosownych konkluzji oraz uzasadniły prowadzenie dalszych prac. Uważne śledzenie narracji pozwala powziąć przepuszczenie, że Autor ma pewne braki w znajomości chemii organicznej oraz nie zawsze przywiązuje wystarczająco dużo uwagi do zagadnień edytorskich. Nadmiernie skomplikowany podział substancji na grupy oraz kodowanie literowe struktur cząsteczek, i nieuzasadnione wprowadzenie części skrótów literowych (np. dla substancji wspomnianych w rozprawie tylko jeden czy dwa razy) robi narrację tej części rozprawy nieco trudniejszą dla rozumienia. Nie zmniejsza to, mimo wszystko, wartości merytorycznej tej części rozprawy.

3. Kolejny rozdział rozprawy *MATERIAŁ I METODY* opisuje w jaki sposób zostało zrealizowane kompleksowe podejście do rozwiązania postawionego problemu, które zwyczajowo się stosuje w tego typu badaniach i wymaga zaangażowania specjalistycznych zespołów do wykonania poszczególnych czynności badawczych oraz analiz. Rozdział

"Materiał i metody" jest bardzo istotny, ponieważ pozwala określić personalny wkład Autora w przedstawione prace badawcze. Zakres prac został prawidłowo określony, Autor samodzielnie wykonywał syntezę związków oraz niektóre obliczenia komputerowe, a wszystkie inne badania zostały zlecone do laboratoriów specjalistycznych zapewniających odpowiednią wiarygodność uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki zostały skompilowane przez Autora, co pozwoliło na wyciągnięcie ogólnych wniosków.

4. Niewątpliwie bardzo ułatwia czytanie rozdziału *WYNIKI I DYSKUSJA* przedstawione wprowadzenie, w którym Autor wyjaśnia strukturę dalszej części oraz stosowaną numerację związków. Rozdział składa się z kilku podrozdziałów: *WYBÓR STRUKTUR WIODĄCYCH DO MODYFIKACJI, SYNTEZA CHEMICZNA, STRUKTURA PRZESTRZENNA, AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA* oraz *MODELOWANIE MOLEKULARNE*.

4a. *WYBÓR STRUKTUR WIODĄCYCH DO MODYFIKACJI*. Autor rozprawy deklaruje, że struktury 10 związków, zaplanowanych do syntezy zostały zaprojektowane na podstawie analizy bibliografii. Takie podejście jest racjonalnie, jednak, ponieważ różnorodność metod badań (stosowanych przez autorów oryginalnych prac) właściwości biologicznych tych związków nie pozwala na ich bezpośrednie porównanie, zasadnym byłoby przeprowadzić najpierw porównanie aktywności związków wiodących w standaryzowanych warunkach, a dopiero później zaprojektować ich modyfikację.

Autor stwierdza, że w najnowszych publikacjach eksperyment *in vivo* jest oparty na zjawisku bioluminescencji, jednak szczegóły tych badań nie zostały podane, brak również odnośników potwierdzających poprawność takiej metodologii. Następnie Autor rozprawy postanawia skupić się na kontynuacji właśnie tych (bioluminescencyjnych) badań, co może wydawać się sprzecznym z wcześniejszą deklaracją racjonalnego wyboru struktur na podstawie analizy SAR. Jest to poniekąd nieścisłość logiczna, która jednak nie podważa zasadności sprawdzenia nowego typu struktur zaprojektowanych w sposób wprowadzenia łącznika metylenowego pomiędzy pierścieniami aromatycznymi a atomami azotu: jest to niewątpliwie, nieujęta w części literaturowej, hybryda struktur A52 oraz A2, która jest warta sprawdzenia. Zaprojektowane modyfikacje struktury A86, należy również uznać za zasadne, chociaż dostrzeżenie podobieństwa zaprojektowanych związków (bis-*N*-metyloanilidów) do piperazyn (str. 115) wymaga sporego natężenia wyobraźni.

4b. SYNTEZA CHEMICZNA. Niestety, z mocy podjętych wcześniej założeń metodologii nazewnictwa, Autor nie prowadzi numeracji związków pośrednich, przedstawionych na poszczególnych schematach np. Rys. 4.10, co poniekąd komplikuje omawianie rozprawy.

W rozdziale 4.2 Autor opisuje syntezę związków, często znanych z literatury, jak to było w przypadku P1, w małej skali reakcji ok. 0.05 mola. I chociaż możliwości laboratorium chemicznego pozwalają na bardziej szczegółową optymalizację warunków, aniżeli sprawdzenie 2 zasad oraz 2 rozpuszczalników i kilku temperatur reakcji, otrzymane wydajności chemiczne należy uznać za satysfakcjonujące, a przedstawiony opis za wystarczający. Przedstawione opisy syntez zawierają mniej istotne merytorycznie zwroty np. „*otrzymano osad, który zmniejszył swoją objętość po wysuszeniu i przemyciu*”, ale natomiast czasami brakuje w nich innych istotnych parametrów reakcji takich jak np. stężenie (Tab. 4.2.). Następnie Autor robi konkluzję, opartą na sprawdzeniu jedynie 5, dość specyficznych rozpuszczalników: „*nie znaleziono rozpuszczalnika, który poprawiłby wydajność reakcji*”, wtedy gdy nie zostały sprawdzone nawet alkohole, inne niż etanol.

W przypadku syntezy *N*-podstawionych pochodnych MR1, Autor stosował klasyczną metodologię, która, ze względu na wysoką reaktywność metyloaminy oraz etyloaminy, nie pozwalała na prowadzenie reakcji w temperaturze pokojowej. Jednak informacja o próbach prowadzenia tej reakcji w niskich temperaturach, stosując metodę stopniowego dodawania aminy, nie została przedstawiona, podobnie jak i tabela przedstawiająca uzyskane wydajności związków MR3-5.

Zaskakującym jednak było stwierdzenie niemożności otrzymania chlorku decylu wspomnianego na stronie 124. Chlorki podobnej budowy są znane, a ich synteza jest kwestią odpowiednio dobranych warunków reakcji.

Mimo należytego opisu w części literaturowej, próby zastosowania innych podejść do przekształcenia grupy nitrylowej w grupę imidynową nie zostały opisane w tym rozdziale.

W kolejnym podrozdziale 4.2.2 Autor odpisuje syntezę nowych anilidów. Ze szczegółowego opisu nieudanej próby syntezy MR6, można się dowiedzieć że Autor „*nie przewidział, że przepis Huanga i wsp. nie sprawdzi się w przypadku reakcji z udziałem dichlorku 2,2`oksydiacetylu*”, chociaż prowadzenie reakcji Schotten-Bauma we wrzącym DMF, a szczególnie z udziałem mniej trwałych związków wyjściowych, rzeczywiście mogło skutkować logicznie powstaniem „*skomplikowanej mieszaniny produktów*”. Następnie Autor sprawdził kilka innych podejść syntetycznych, i na podstawie przeprowadzonych prób stwierdził, że metoda Pinnera ma spore ograniczenia w zastosowaniu w przypadku anilidów,

gdyż ostatnie ulegają solwolizie w warunkach reakcji. Zresztą o takiej wrażliwości Autor już wspominał w swojej rozprawie na stronach 64 oraz 69.

Ostatecznie została wybrana strategia, w której użyto związku wyjściowego zawierającego zamaskowaną grupę imidynową – czyli podstawnik oksadiazolowy otrzymywany z odpowiedniego nitrylu w sposób standardowy. Podobnie jak poprzednio numeracją jest objęta jedynie część związków, schematy nie zawierają zwyczajowo podanych danych eksperymentalnych, a opis przeprowadzanych syntez mógłby być bardziej nieczytelny, gdyby opis syntezy bardzo prostych cząsteczek typu P4 lub P5 nie zastał pofragmentowany na kilka osobnych podrozdziałów wypełniających kolejne strony rozprawy. Wszystko to sprawia, że dla lepszego rozumienia narracji niezbędnym jest sprawdzenia oryginalnych prac, w których opisano syntezę tych związków.

Na osobną uwagę zasługuje obserwacja Autora, że „*mieszanina reakcyjna jaśniała w miarę postępu reakcji*”: nie do końca wiadomo w jaki sposób przyczyniło się to do pozbawiania się zanieczyszczeń, gdyż brak koloru leuco-barnika, powstającego w wyniku redukcji, nie koniecznie oznacza nieobecność tej substancji w mieszaninie. Tudzież sformułowanie „*otrzymany produkt był kremowym osadem*” nie jest szczególnie trafione.

Pożądane związki zostały jednak otrzymane w reakcji z odpowiednimi chlorkami diacylu, gdy taka reakcja była przeprowadzana w temperaturze pokojowej. W tym rozdziale należałoby umieścić tabelę zawierającą uzyskane wydajności chemiczne poszczególnych związków P oraz MR otrzymywanych przez Autora.

4c. Następny podrozdział „PRZEPISY PREPARATYWNE I IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW” również nie budzi większych zastrzeżeń. Rozdział jest napisany prawidłowo, a tabularne przedstawienie widm oraz analiz znacznie ułatwia czytanie rozdziału.

Kilka uwag technicznych:

Na czym polega różnica pomiędzy stwierdzeniami "tożsamość związku udokumentowano poniżej", a "tożsamość produktu zweryfikowano poniżej"?

Brak danych analiz dla związków P3, P4.

Zwrot "*jednorodny chromatograficznie*" nie jest określeniem ogólnie przyjętym. Dodatkowo warty uwagi jest fakt, że metoda TLC nie pozwala na stwierdzenie tego, że związek jest czysty, gdyż nieodpowiednio dobrany skład elementów zawsze wykaże "*jednorodną chromatograficznie*" plamkę. Metod TLC (poprzez stosowanie substancji referencyjnych) pozwala jedynie na stwierdzenie, że znane zanieczyszczenia znajdują się w próbce poniżej

poziomu ich wykrywalności tą metodą, który z kolei zależy od współczynnika absorpcji światła UV i bardzo się różni dla różnych związków.

W przypadku syntez wg znanych z literatury przepisów należy cytowanie prace oryginalne.

str. 144. Autor pisze – "*osad diamidyny w postaci wolnej zasady...*" wtedy jak zgodnie z przepisem powinna była powstać sól...

str. 144. Autor zaznaczył w procedurze eksperymentalnej że stosował eluent E1, jednak nie podał składu, a nie odwołania do odpowiedniego miejsca w którym skład tej mieszaniny został podany, co w stopniu istotnym utrudnia zrozumienie tego jak dokładnie był syntetyzowany związek. Ponownie podkreślę brak zasadności wprowadzania randomizowanych skrótów.

str. 144. Autor stwierdza czystość związku na podstawie TLC, wtedy jak widma NMR wskazują na obecność zanieczyszczeń.

str. 150. Autor pisze – "*osad diamidyny w postaci wolnej zasady...*" wtedy jak zgodnie z przepisem powinien był powstać chlorowodorek...

str. 155. Autor deklaruje, że wydmno zostało zrobione dla substancji rozpuszczonej w DMSO, wtedy jak widmo sugeruje że rozpuszczalnikiem mógł być chloroform.

str. 157. Nie jasno jak była podtrzymywana temperatura 0 °C powolnie wkraplanego roztworu diacylu, a jeśli nie była kontrolowana to czemu służyło początkowe chłodzenie tego roztworu?

str. 158. Zaskakującą jest dokładność do 5 tysięcznych grama, z jaka otrzymany został produkt pomimo wieloetapowej procedury oczyszczania.

4d. Następny podrozdział zatytułowany "STRUKTURA PRZESTRZENNA" zawiera opisy struktur krystalograficznych otrzymanych we współpracy z innym badaczami. Autor wykorzystuje otrzymane dane, by eksperymentalnie potwierdzić, że "*Niewskazane jest zatem przewidywanie struktur diamidyn na podstawie znanych struktur odpowiednich dinitryli*". Twierdzenie jest zdecydowanie zasadne i logicznie, a po jego akceptacji stanowi się jasno, że badanie rentgenostrukturalne związku N162 (rozdział 4.3.1.3), otrzymanego w trakcie wykonania pracy magisterskiej, nie powinno się znajdować w rozprawie doktorskiej nie tylko z powodów formalnych, ale również merytorycznych.

W części opisującej widma ¹³C CP/MAS przedstawione są jedynie wnioski (lub też przypuszczenia) uzyskane w oparciu na wyniki obliczeń, ale niestety zabrakło danych dotyczących metodologii tych badań tudzież obliczeń. Dlatego zrozumienie tego jak Autor

doszedł do zaprezentowanych wniosków jest trudne. Może to też wskazywać na bardziej ścisłą współpracę Autora rozprawy z osobami realizującymi pomiary JRM. Tak czy inaczej, podobnie jak w przypadku omówienia struktur rentgenowskich, zasadność omówienia związków N82, N161-164, otrzymanych w trakcie wykonywania pracy magisterskiej i niemających bezpośredniego przełożenia na struktury badanych diamidyn, budzi wątpliwości, gdyż nie skutkuje to lepszym zrozumieniem, jaką strukturę będą mieć cząsteczki diamidyn w roztworze oraz w kompleksie z DNA.

Podsumowując uwagi do części SYNTEZA CHEMICZNA, z pewnością można stwierdzić, że umiejętnie operując, zaledwie kilkoma prostymi w realizacji i wydajnymi przekształceniami chemicznymi, w maksymalnie 5 etapach syntetycznych, Autor otrzymał 10 wcześniej nieopisanych w literaturze diamidyn. Prostota opisanych procedur syntetycznych dobrze świadczy o potencjalnej możliwości ich praktycznego wdrożenia. Część chemiczna spełnia wymagania zwyczajowo stawione wobec prac doktorskich.

4c. Aktywność biologiczna. W tym rozdziale Autor przedstawił wyniki badań zrobionych we współpracy z innymi jednostkami. Aktywność biologiczna otrzymanych związków została zbadana kompleksowo. Przede wszystkim zostały przeprowadzone badania aktywności anty-*Pneumocystis carinii*, które wykazały że (z wyjątkiem MR2,3,7) otrzymane nowe związki są bardziej aktywne aniżeli referencyjna pentamidyna, a zarazem są mniej toksyczne. Następnie została zbadana selektywność działania nowych związków i, w przypadku 17 przetestowanych drobnoustrojów (bakterii i grzybów) okazała się ona lepszą od referencyjnej pentamidyny. Zgodnie z oczekiwaniami nowe związki nie wykazały aktywności przeciwnowotworowej, a nie powinowactwa do receptorów NMDA. Wszystko to rzeczywiście uzasadnia przeszczenia Autora że badane substancje selektywnie oddziałują z DNA *Pneumocystis carinii*. Część biologiczna jest klarownie napisana i dobrze uzasadniona, jednak mankamentem części jest to, że Autor nie wykonał sprawdzenia aktywności wszystkich związków wiodących w warunkach ujednoczonych, a jedynie wykorzystał dane literaturowe. Zmniejsza to dokładność wykonywanych pomiarów.

Drobne uwagi natury technicznej:

Wyniki badań nad aktywnością biologiczną związków A161-164 nie powinny być uwzględniane w rozprawie doktorskiej, gdyż związki A161-164 zostały syntetyzowane w

trakcie wykonania pracy magisterskiej, a badania biologiczne zrealizowane jako podwykonawstwo.

str. 195. Prawdopodobnie wzór zawiera pomyłkę: brakuje dwóch grup metylenowych.

4d. Modelowanie molekularne. W tym rozdziale Autor przedstawił wyniki badań, w których modelowano oddziaływania DNA *Pneumocystis carinii* z syntetyzowanymi substancjami. Badania zostały oparte o model QSAR umożliwiający przewidywanie aktywności biologicznych nowych związków poprzez symulowanie interakcji z parami zasad A-T w obrębie małego rowka DNA. Wychodząc z założenia, że, ze wzrostem wartości absolutnej entalpii tworzenia kompleksów związków i DNA, wrasta również ich aktywność biologiczna; oraz, że, obserwowana w cieple stałym tudzież obliczona w próżni, konformacja cząsteczek jest podobna do ich konformacji w kompleksie, przeprowadzono szereg obliczeń ilościowych. Wyniki obliczeń okazały się być zgodne z eksperymentalnymi danymi dotyczącymi aktywności biologicznej. Ta obserwacja potwierdza założony mechanizm działania zaprojektowanych związków oraz pozwala na zrobienie przypuszczeń odnośnie struktury powstających wiązań chemicznych w kompleksie molekularnym badanych substancji z DNA. Taka szczegółowa analiza oddziaływań w przyszłości może pozwolić na racjonalne zaprojektowanie jeszcze bardziej aktywnych leków oddziałujących z DNA wg. badanego mechanizmu.

Drobne uwagi natury technicznej:

str. 203. Na rysunku 4.113 są przedstawione niebieskie punkty, które wg Autora odpowiadają związkom, na podstawie których wyznaczono prostą regresję liniową. Jednak nie podano, co to są za związki i dlaczego wybór takich związków gwarantuje poprawność obserwowanej zależności.

str. 207. Rozprawa zawiera wiele rysunków przedstawiających modele dokowania związków do DNA oraz ogólne opisy oddziaływań, które Autor znalazł w obliczonych modelach. Niestety zabrakło w tej części bardziej szczegółowego opisu z podaniem długości wiązań oraz wskazaniem oddziaływających grup i atomów. Przykładowo Autor pisze - *"wyróżnia się on ponadto licznymi wiązaniami π -alkil oraz wodorowymi, w których bierze udział grupa metylowa, dołączona do amidowego atomu azotu"* (), nie jasno jednak z jakimi fragmentami DNA oddziałuje ta grupa - opis jest zbyt ogólnikowy.

str. 207. Niezrozumiałe jest twierdzenie *"...liczne wiązania wodorowe, głównie z udziałem atomów węgla"*.

6. Osiągnięte przez mgr farm. Mateusza Rezlera wyniki zostały przedstawione w sposób wyczerpujący w rozdziale dysertacji „WNIOSKI”. Ten niespełna trzystronicowy tekst obrazuje w 5 punktach konkluzje charakteru ogólnego oraz perspektywy dalszych badań. Wnioski mają charakter ogólny i stanowią klarowne i proste podsumowanie wykonanych badań. Przedstawione wnioski pozwalają przejść do konkluzji, że postawiony cel pracy - „*poszerzenie bazy diamidyn o znanej aktywności anty-Pneumocystis o nowe związki oraz analizę zależności pomiędzy wprowadzonymi modyfikacjami a aktywnością biologiczną*” został pomyślnie zrealizowany.

7. Rozdział ZAŁĄCZONE PUBLIKACJI zawiera wydruk 6 publikacji oryginalnych z których publikacji D1, D2 zawierają wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej, publikacji D3-D5 głównie opisują metodologię wykorzystaną w trakcie przygotowania rozprawy, wtedy jak materiał pokonferencyjny D6 dotyczy treści rozprawy pośrednie.

Reasumując powyższe uwagi, mogę stwierdzić, że oceniana praca doktorska została zredagowana w sposób pozwalający na zrozumienie osiągniętych wyników. Lektura rozprawy nasunęła mi bardzo nieliczne uwagi merytoryczne, które zostały wymienione powyżej. Te uwagi nie mogą wpłynąć na pozytywną ocenę rozprawy. Jej lektura dowodzi, że postawione zadania zostały zrealizowane. Realizacja planowanych badań oraz redakcja rozprawy dowodzą, że jej Autor jest wszechstronnie wykształconym naukowcem, zdolnym do zaprojektowania i samodzielnej realizacji złożonych programów z zakresu chemii farmaceutycznej, jak również do nawiązanie owocnej współpracy, umożliwiającej określanie struktur nowych połączeń chemicznych oraz ich właściwości biologicznych, przy wykorzystaniu dostępnych nowoczesnych technik w tym kwantowo-chemicznych obliczeń teoretycznych oraz umiejętnej prezentacji otrzymanych wyników.

W świetle tej oceny stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim przez paragraf 6.4 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. (Dz.U Nr. 204 poz. 1200 z dnia 22.09.2011) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie jej Autora, Pana mgr farm. Mateusza Rezlera, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.