



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII ORGANICZNEJ

PROF. DR HAB. LUCJUSZ ZAPRUTKO

ul. Grunwaldzka 6
60-780 Poznań

tel. 061 854 66 70

fax 061 854 66 80

e-mail: zaprutko@ump.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr chem. Kingi Marii Kasperkiewicz

z tytułowanej

„Nowe pochodne kumaryny o potencjalnej aktywności antykoagulacyjnej”

wykonanej pod opieką naukową prof. dr hab. n. farm. Elżbiety Budzisz

– jako promotora

oraz dr hab. Michała Ponczka – jako promotora pomocniczego

w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych

Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kumaryna to stosunkowo prosty związek naturalny, bardzo szeroko rozpowszechniony w przyrodzie. Jej liczne pochodne zawierające skondensowane z nią pierścienie lub podstawniki acykliczne i to zarówno występujące w formie wolnej, jak i związanej glikozydowo znajdują wielokierunkowe zastosowania, w tym m.in. jako leki o bardzo zróżnicowanym działaniu. Powszechnie opisywane są np. właściwości antyoksydacyjne, promieniochronne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, tuberkulostatyczne, hipoglikemiczne, hipotensyjne, przeciwnowotworowe i kluczowe dla ocenianej pracy, właściwości antykoagulacyjne. Oprócz tych niezwykle cennych działań wielokrotnie wspomina się o niekorzystnym wpływie niektórych pochodnych kumaryny na organizmy żywe, przy czym działanie to jest specyficzne gatunkowo i niekiedy w sposób istotny różne dla człowieka i dla typowych zwierząt laboratoryjnych. U człowieka najczęstsze doniesienia mówią o działaniu nefro- i hepatotoksycznym. Dlatego problem wykorzystania szkieletu kumaryny jako nośnika nowych udoskonalonych właściwości będących konsekwencją wprowadzenia do niej nowych niespecyficznych grup funkcyjnych, wydaje się być niezwykle interesujący i ważny z praktycznego punktu widzenia, gdyż niosący w sobie ogromny potencjał możliwości aplikacyjnych, nie tylko w kierunku wskazanym w dysertacji. Powyższe fakty upoważniają mnie do stwierdzenia, że temat pracy doktorskiej został bardzo celnie wybrany a jej konsekwentny sposób realizacji pozwolił osiągnąć zamierzony cel w znacznie rozszerzonym zakresie. Autorka bowiem w rozdziale „Cel i założenia pracy” sprecyzowała bardzo zwięźle „Główny cel badań” uzupełniając go o „Szczegółowe cele pracy”, które stanowią znaczne rozszerzenie tego celu głównego a nie jego uszczegółowienie. Jednak podkreślić w tym miejscu z całą stanowczością należy, że wszystkie wymienione cele szczegółowe zostały w ramach zaprezentowanego cyklu publikacji osiągnięte i przy tym z sukcesem opublikowane w znaczących w świecie nauki czasopismach.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr chem. Kingi Marii Kasperkiewicz jest zbiorem trzech spójnych tematycznie publikacji o sumarycznej wartości IF = 7,812. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem. Do prac tych dołączono komentarz wprowadzający zawarty na 27 stronach, krótkie 1-2 stronicowe omówienie każdej z publikacji oraz zestaw 11 wniosków, streszczenie i wykaz piśmiennictwa. Te elementy oprawiono w zwarte dzieło, a oddzielnie przedstawiono do wglądu recenzenta życiorys naukowy Kandydatki oraz zestaw oświadczeń dokumentujących wyrażony procentowo udział poszczególnych autorów w przygotowaniu publikacji będących przedmiotem postępowania doktorskiego. W każdym przypadku udział Doktorantki był zdecydowanie dominujący i wynosił od 55 do 80%.

Recenzowana praca doktorska prezentuje, zgodnie z tytułem, syntezę, badania struktury oraz elementy modelowania molekularnego dla szeregu nowych związków będących pochodnymi kumaryny. Związki te zostały również poddane badaniom biologicznym, w tym głównie określono ich aktywność antykoagulacyjną. Uzyskany materiał doświadczalny został w bardzo dobry sposób usystematyzowany i przyporządkowany do publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień doktora nauk farmaceutycznych. Owe trzy publikacje stanowią jak gdyby odzwierciedlenie trzech najbardziej typowych części wchodzących w skład pracy doktorskiej przygotowywanej w klasycznej formie. Pierwsza z publikacji, zatytułowana „Sunscreening and Photosensitizing Properties of Coumarins and their Derivatives”, będąca typową pracą przeglądową, jest odpowiednikiem części teoretycznej pracy o charakterze monograficznym. Druga z prac, wydana pod tytułem „Design, Synthesis, X-ray Structures of the New Coumarin Derivatives and Perspectives of Binding Them to Albumin and Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit 1” odpowiada części chemicznej w klasycznej pracy doktorskiej z zakresu chemii medycznej. Natomiast trzecia praca, załączona w formie zaakceptowanego do druku manuskryptu, który aktualnie jest już powszechnie dostępną publikacją, zatytułowana „A biological, fluorescence and computational examination of synthetic coumarin derivatives with antithrombotic potential” jest odpowiednikiem części biologicznej wymienionego wcześniej typu pracy. Łącznie więc ów cykl wypełnia wszystkie elementy dysertacji o charakterze klasycznym i w ten sposób może być również rozpatrywany.

Pierwsza z prac cyklu opisuje dostępne w piśmiennictwie dane na temat kumaryny i jej pochodnych zwracając szczególną uwagę na ich właściwości fotouczulające i fotochronne, czyli na cechy o dużym znaczeniu w obszarze zastosowań kosmetycznych związków kumarynowych. Zwrócono tutaj także uwagę na ich metabolizm oraz różne formy toksyczności, przy niemal całkowitym braku możliwości kumulowania się jej w organizmie człowieka. Przeanalizowano w tej pracy także pewne, wybrane elementy prezentujące zależności pomiędzy strukturą a aktywnością związków z tej grupy. W konkluzji stwierdzono, że z przeglądu tego wyraźnie wynika potrzeba prowadzenia dalszych badań zmierzających do otrzymania nowych pochodnych kumaryny powstających w zaplanowany sposób w toku tzw. „syntezy celowanej”.

W kolejnej pracy skupiono się na samej syntezie nowych związków oraz na określeniu ich struktury i wybranych cech fizykochemicznych związanych głównie z ich wiązaniem do niektórych białek ustrojowych i do wybranych miejsc receptorowych. Praca ta ma kluczowy charakter dla całej dysertacji z dwóch powodów: to w niej właśnie są omówione założenia do syntezy i sama synteza nowych pochodnych kumaryny, a także względny procentowy udział Doktorantki w przygotowaniu tej pracy doświadczalnej jest największy. Metodyka otrzymywania owych nowych związków kumarynowych, jak sama Doktorantka wskazuje na str. 15 swojego opracowania, została już wcześniej opracowana w zespole Pani Profesor Budzisz, a tutaj jedynie w skuteczny sposób została wykorzystana. Reakcja stosowana w tym celu jest dość specyficzna i z tego powodu wysoce oryginalna. Prowadzi do przekształcenia ugrupowania estrowego w układ iminowy z jednoczesnym przegrupowaniem sąsiedniego podstawnika węglowodorowego. W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymano zasadniczo

trzy nowe związki, z których każdy może występować w trzech formach tautomerycznych. Wszystkie te formy (w łącznej liczbie 9, w tym 7 nowych) wydzielono i scharakteryzowano spektralnie, przeprowadzając ich pełną identyfikację. I nie byłoby w tym nic nadzwyczajnego gdyby nie wyjątkowo dobrze dobrana i zrealizowana nadbudowa badawcza o charakterze pomiarowym i obliczeniowym wykorzystana do wyczerpującego opisu wszystkich możliwych cech cząsteczek. Przede wszystkim w pracy tej zaprezentowano analizę krystalograficzną reprezentatywnych związków z tej grupy, podejmując przy tym szczegółową dyskusję uzyskanych wyników i wyciągając z tego odpowiednie wnioski. Ponadto wykonano modelowanie wiązania się tych związków z typowymi dla nich białkami receptorowymi, wskazując sposób, siłę i rolę powstających oddziaływań i porównując te cechy z analogicznymi parametrami dla warfaryny, stosowanej tutaj jako układ odniesienia. W konkluzji tej pracy wyciągnięto kilka istotnych, poprawnie sformułowanych wniosków o charakterze bardziej obserwacyjnym niż odkrywczym.

Trzecia z cyklu publikacji opisuje badania teoretyczne i biologiczne cech skorelowanych z aktywnością przeciwzakrzepową nowych pochodnych kumaryny, opisanych we wcześniej omówionej pracy. Wśród nich są m.in. określenie zdolności wiązania się tych związków z albuminą ludzką prowadzone metodą wygaszania fluorescencji oraz wyznaczenie teoretycznych i eksperymentalnych wartości lipofilowości, a także oznaczenie ich cytotoksyczności w teście LDH. Wykonane oznaczenia pozwoliły na wskazanie najbardziej obiecującego związku jako potencjalnego leku antykoagulacyjnego, jednak zakres przeprowadzonych badań, w opinii Doktorantki, jest zbyt mały by jednoznacznie wyrokować o możliwościach praktycznych zastosowania którejkolwiek z syntezowanych i opisywanych substancji.

Przedstawione mi do oceny dzieło, to poza zestawem publikacji, także wspomniany wcześniej komentarz oraz wnioski będące efektem wspólnego i spójnego spojrzenia na wszystkie prace stanowiące ów monotematyczny cykl. W rozdziale „Wnioski” przedstawiono w formie wypunktowanej 11 ujętych hasłowo stwierdzeń podsumowujących uzyskane rezultaty. Początkowe z nich przedstawiają właśnie bardziej podsumowanie wyników pracy, wskazując na ilościowe efekty badań, niż prezentując faktyczne wnioski. Do tych ostatnich Autorka przechodzi dopiero mniej więcej w połowie tego rozdziału. Dlatego uważam, że w tego typu opracowaniach o wiele lepiej i „bezpieczniej” jest tak ujęty rozdział nazywać „Podsumowanie i wnioski”, co pozwala na zamieszczenie w nim stwierdzeń obydwu wymienionych typów.

W ostatnim z rozdziałów zebrane zostało piśmiennictwo wykorzystane do przygotowania początkowej tzw. „części literaturowej” opracowania. W pewnej mierze pokrywa się ono z piśmiennictwem wykorzystanym w poszczególnych publikacjach, co zresztą jest w pełni uzasadnione. W zestawie tym, na 43 wymienione pozycje, jedynie 16 pochodzi z okresu ostatnich 10 lat a niemała grupa cytowanych prac opublikowana była jeszcze w poprzednim wieku, w tym niektóre ponad 50 lat temu. Ze względu jednak na fakt, że kumaryna i jej pochodne są związkami znanymi od wielu dziesięcioleci takie proporcje również można uznać za uzasadnione. Zbędnym natomiast, w opinii recenzenta, wydaje się podawanie tego samego piśmiennictwa zarówno w formie przypisów dolnych na stronie ich wykorzystania, jak i równoległe w postaci spisu na końcu pracy. Ten drugi sposób wydaje się być bardziej praktyczny, choćby ze względu na łatwość powtórnego zacytowania pracy pojawiającej się po raz pierwszy parę stron wcześniej.

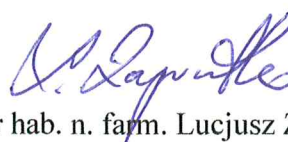
Odnosząc się do podstawowego elementu opracowania, czyli komentarza do cyklu publikacji stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktorski, chciałbym wskazać na fakt bardzo dobrego, jasnego i przekazującego umiejętnie dobrane najważniejsze informacje poprowadzenia dyskusji w tej właśnie części. Pod względem merytorycznym jest ona ujęta w sposób godny pochwały, jednak wkrađło się do niej kilka błędów wynikających zapewne z zastosowania skrótów myślowych jasnych dla Autorki, ale już niekoniecznie dla postronnego czytelnika. Wśród nich wymieniałbym m.in.:

- Użycie na stronie 11 zwrotu „kumaryny podstawione na pierścieniu pironowym”, co w mojej opinii jest błędne, gdyż podstawienie ma miejsce w pierścieniu a nie na nim.
- Do schematu 6 na stronie 16 może warto byłoby pokusić się o dodanie sugerowanego mechanizmu reakcji pochodnych estrowych kumaryny z aminami, gdyż sposób zachodzenia zmiany położenia grupy R² nie jest powszechnie oczywisty.
- Przy tej okazji pojawia się jeszcze jedna uwaga. Otóż lokanty wskazujące numer kolejny podstawnika, jak np. R² powinny być edytowane w formie indeksu górnego a nie dolnego, co jest zarezerwowane dla wyrażania liczości tych podstawników.
- Znaczące przejęzyczenia nomenklatury pojawiają się na schemacie 7 na stronie 17. To co zostało nazwane kwasem *p*-kumarynowym jest po prostu kwasem *p*-hydroksycynamonowym. Kwas ten w żaden sposób nie może być substratem do powstania kumaryny. Użyta nazwa kwas *o*-kumarynowy nie wymaga umieszczenia lokanta wskazującego na podstawienie *orto*-, bo kwas kumarynowy musi być izomerem *orto*. Natomiast cennym by było gdyby Doktorantka zwróciła uwagę na możliwość występowania izomerycznych kwasów kumarynowego i kumarowego, i odpowiednio ich pochodnych, w tym również cytowanych na tym schemacie. Ponadto związek nazwany „kwas 2,4-dihydroksycynamonowy” nie jest ani podstawiony 2,4-, ani nie jest kwasem, ani nie ma szkieletu cynamonowego.
- Również jasność Rysunku 9 na stronie 27 budzi pewne moje wątpliwości. Jeśli ma on obrazować reakcję epoksydacji to strzałka powinna być skierowana w przeciwną stronę a ponadto dobrze byłoby wyjaśnić znaczenie symbolu „R”, bo z zamieszczonego poniżej wzoru witaminy K można się tego jedynie niejednoznacznie domyślać.
- Inne podobnego typu usterki mają mniejsze znaczenie i na tym etapie oceny mogą być pominięte.

Powyższe uwagi mają za zadanie jedynie zwrócić uwagę na pewne drobne potknięcia językowe a nie próbę negocjowania niewątpliwie wysokiego poziomu przedstawionej pracy. Na podkreślenie w tym miejscu zasługuje sposób realizacji ocenianej pracy doktorskiej w ramach programu Umed-3-Bioscience jako Interdyscyplinarne studia doktoranckie w zakresie nauk biomedycznych, podczas których Doktorantka odbyła 3-miesięczny staż naukowy w Université de Paris-Sud Orsay – Laboratoire de Chimie Physique d’Orsay.

Podsumowując, opublikowanie przez Doktorantkę wszystkich wyników badań w cenionych specjalistycznych czasopismach naukowych świadczy o dużej aktualności podjętej tematyki naukowej oraz wskazuje, że zaplanowane eksperymenty zostały dobrze przemyślane, zrealizowane i opisane. Z uznaniem należy podkreślić fakt, że stanowiąca główny cel pracy synteza nowych pochodnych kumaryny została znacznie wzbogacona o szeroki zestaw doświadczeń fizykochemicznych, biologicznych i obliczeniowych przez co praca nabrała jakże cennego charakteru interdyscyplinarności. Wskazuje to ponadto na zdolność organizacyjną Doktorantki w zakresie tworzenia zespołów badawczych, skupiających się na umiejętnym, szerokim spojrzeniu na pojedynczy problem naukowy. Wszystko to pozwala mi wysoko ocenić przedstawioną pracę doktorską Pani mgr Kingi Kasperkiewicz i jednoznacznie stwierdzić, że spełnia ona wszystkie wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, zawarte w aktualnie obowiązujących regulacjach prawnych. Dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani magister Kingi Kasperkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, prowadzących do uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

Poznań, dnia 10 października 2018 r.



Prof. dr hab. n. farm. Lucjusz Zaprutko

Prof. dr hab. n. farm.
Lucjusz Zaprutko