

Poznań, 9 września 2019

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry SINGH**  
**pt. „Synteza oraz badania aktywności cytotoksycznej nowych analogów nukleozydów pirymidynowych**  
**o zmienionej konfiguracji na atomie węgla w pozycji 2' lub 3',,**

Praca doktorska mgr Aleksandry SINGH została przygotowana pod kierunkiem Pana Dr. hab. Lecha CELEWICZA, Prof. Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii. Zespół Pana profesora Lecha CELEWICZA prowadzi od szeregu lat badania w zakresie syntezy nukleozydów, nukleotydów i ich analogów oraz badania ich właściwości biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych zastosowań jako związków przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych.

Nukleozydy i nukleotydy stanowią, przynajmniej formalnie, klasy składników kwasów nukleinowych. W klasach tych związków małowcząsteczkowych poszukuje się od kilku dziesiątków lat potencjalnych leków. Koncepcja ta opiera się na założeniu, że celowe dostarczenie tego typu związków do komórek organizmu wpłynie na zmianę równowagi metabolicznej w komórkach, czyli stwarza szansę, albo na zmianę homeostatycznej równowagi komórki w stanie nowotworowym w kierunku układu charakterystycznego dla komórek normalnych, albo doprowadzi do śmierci komórki nowotworowej (na drodze tzw. śmierci kontrolowanej czyli *apoptozy*). Wprowadzenie omawianych związków małowcząsteczkowych do komórki może wpłynąć na jej metabolizm na wiele sposobów, których nie sposób opisać bez każdorazowych szczegółowych analiz. Można jednak w dużym uproszczeniu powiedzieć, że wpływ ten jest możliwy ze względu na ich interakcje z metabolizmem kwasów nukleinowych. A zatem jako możliwe skutki można wymienić terminację syntezy kwasów nukleinowych, wprowadzenie zmian zakłócających ich funkcję, czy też inhibicję enzymów odpowiedzialnych za szeroko rozumiany metabolizm kwasów nukleinowych. Jasne jest zatem, że niezbędny jest transport do komórki, oraz odpowiednia trwałość w komórce. Sprzyjają realizacji wspomnianych celów odpowiednia modyfikacja struktury (stąd analogi naturalnych nukleoz/tydów), czy koncepcja tzw. *proleków*. Potencjalne leki, pochodne nukleotydów, powinny mieć zoptymalizowaną przenikalność przez błony komórkowe, tak aby mogły one osiągnąć docelową lokalizację komórkową.

Profesor Lech CELEWICZ i jego współpracownicy w Pracowni Chemii Nukleozydów i Nukleotydów Wydziału Chemii UAM badają te problemy od kilku już lat. Na drodze modyfikacji podstawowych nukleozydów czy nukleotydów próbują, podobnie jak inni badacze, zarówno zwiększyć aktywność, selektywność działania, a poprzez wykorzystanie wspomnianej już wyżej koncepcji tzw. *Proleków*, zwiększyć ich stabilność przed wniknięciem do komórek, jednocześnie ułatwić ich przenikanie przez błony komórkowe.

Rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry SINGH zawiera krótkie streszczenie oraz jego angielską wersję (abstrakt), wstęp, po którym następuje bardzo obszerna część literaturowa. Autorka następnie przedstawia cel badań, wyniki badań własnych wraz z dyskusją (Dyskusja wyników), część doświadczalną, podsumowanie, oraz spis literatury (300 pozycji literaturowych). Rozprawa zawiera spis treści i skrótów. Praca została spisana na 262 numerowanych stronach i nie zawiera spisu schematów, rysunków oraz tabel. Układ pracy jest tradycyjny. Sposób cytowania odnośników literaturowych obejmuje tytuły publikacji, co ułatwia czytającemu wstępne rozpoznanie ich przedmiotu.

Zasadniczym celem pracy doktorskiej mgr Aleksandry SINGH była synteza nowych analogów nukleozydów pirymidynowych o odwróconej konfiguracji na atomie węgla w pozycji 2' lub 3' z, jak to określiła, „praktycznym zastosowaniem koncepcji pronukleotydu” w postaci 5'-amidofosforanów. Wybrane zostały następujące nukleozydy: cytarabina, rybotymidyna oraz tymidyna, a z nich pozyskano odpowiednie układy cykliczne, anhydronukleozydowe. W swojej pracy doktorskiej Doktorantka posłużyła się także koncepcją otrzymania nowych związków o budowie bifunkcyjnej, tzw. *twindrugs*.

Pan dr Piotr RUSZKOWSKI z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, który od lat współpracuje z Prof. Celewiczem, otrzymane przez Doktorantkę związki, zbadał pod kątem ich cytotoksyczności względem wybranych nowotworowych linii komórkowych.

Część literaturowa rozprawy doktorskiej jest bardzo obszerna i obejmuje szeroki wachlarz zagadnień z obszaru chemii kwasów nukleinowych i aktywności biologicznej wybranych analogów nukleozydów. Wszystkie poruszane zagadnienia znajdują w pewnej mierze odzwierciedlenie w badaniach Doktorantki, a potem i dyskusji uzyskanych przez nią wyników, trudno jednak oprzeć się wrażeniu, że aspektów jest zbyt wiele. Mam wrażenie, że przegląd zyskałby na ograniczeniu się do najważniejszych kwestii, takich jak np. synteza układów anhydronukleozydów i 5'-amidofosforanów. Może udałoby się uniknąć pewnej powierzchowności i niektórych błędów. (Podaję przykłady takich uchybień: str. 40 Schemat 14; str. 42 Schemat 16, jakie acyle?; str. 55 –  $Cp^*RuCl(PPh_3)_3$ ; str. 57 1,4-triazole; str. 62 znakowany kwasem borowym koniugat **57**; str. 93 dziwna struktura amidofosforanu **100**.) Nie mniej, przegląd stanowi użyteczną podstawę dla oceny uzyskanych rezultatów doświadczeń i ich dalszej dyskusji.

Pani mgr Aleksandra SINGH zrealizowała cele swojej pracy doktorskiej. Udało jej się otrzymać szereg nowych pochodnych w postaci 5'-amidofosforanów. Przeprowadziła także udane próby 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów katalizowanej kompleksami rutenu(II) otrzymując regioizomery 1,5-podstawione (np. str. 159). To osiągnięcie zasługuje na podkreślenie, ponieważ większość opisanych w literaturze pochodnych cykloaddycji azydków do alkinów to regioizomery 1,4-podstawione powstające w syntezie wg Huisgena.

Syntezy 5'-amidofosforanów analogów nukleozydów pirymidynowych o odwróconej konfiguracji na atomie węgla w pozycji 2' lub 3' obejmowały wcześniejszy etap cyklizacji z udziałem atomu tlenu O-2 reszty pirymidynowej. Doktorantka wykorzystywała metody cyklizacji opisane wcześniej w literaturze, jednak w wielu przypadkach porównywała różne metody cyklizacji, wybierając do dalszych syntez te, które uznała za wygodniejsze z praktycznego punktu widzenia, optymalne. W tym względzie z pewnością możliwa byłaby dalsza optymalizacja, gdyż wachlarz metod opisanych jest bardzo szeroki. Tym nie mniej, ten aspekt pracy uważam za interesujący dla chemików zajmujących się tą częścią chemii nukleozydów, również obecnie. Kolejny istotny problem, którego rozwiązanie było konieczne, to etap skutecznej fosforylacji grup 5'-hydroksylowych, a następnie przejście do 5'-amidofosforanów. Ostatecznie, te pochodne amidofosforanowe, które Pani mgr SINGH opisała, zawierały proste reszty alkilowe jako podstawniki amidowego atomu azotu. W trakcie realizacji tego fragmentu pracy Doktorantka natrafiła na trudności z otrzymaniem, opisanych w literaturze przedmiotu, pochodnych aminokwasowych swoich substratów. Wydaje się, że trudno wytłumaczyć zależność przebiegu reakcji fosforylacji i następczej syntezy amidów aminokwasowych od charakteru nukleozydu. W związku z tym będę oczekiwał dyskusji tego zagadnienia w czasie obrony doktorskiej. To zagadnienie jest o tyle istotne, że w koncepcji proleków realizowanej przez Prof. CELEWICZA możliwość wprowadzania większej gammy podstawników amidowych mogłaby doprowadzić do kolejnych interesujących aktywnych biologicznie 5'-amidofosforanów analogów nukleozydów.

Pani mgr SINGH opisała swoje chemiczne 'potyczki doświadczalne' z decytabiną (5-aza-2'-deoksycytydyna) na początku rozdziału *Dyskusji wyników* i ten fragment pracy uważam za interesujący, mimo że nie doprowadził Autorki do sukcesu. To ważny analog nukleozydowy, stąd doniesienia o nawet nie do końca udanych doświadczeniach wzbogacają wiedzę w obszarze chemii nukleozydów.

Dyskusję wyników kończy Doktorantka opisem syntezy i właściwości biologicznych dimeru cytarabiny i AZT (207) informacją o indeksie selektywności, ale tych danych nie udało mi się w pracy znaleźć.

Doktorantka bardzo dobrze opanowała metody syntezy organicznej nukleozydów i nukleotydów. W całej pracy widoczna jest biegłość w posługiwaniu się analizą widm NMR. Natomiast, nie wydaje mi się właściwe umieszczanie zbyt wielu szczegółów doświadczalnych w Dyskusji wyników, a za takie uważam zamieszczanie schematów chromatogramów cienkowarstwowych. Tak naprawdę właściwsze byłoby ograniczenie się do podania wartości  $R_f$ . Często miałem wrażenie, że było to tłumaczenie trudności z uzyskaniem czystego produktu na drodze rozdzielania chromatograficznego.

Opracowanie syntezy tak wielu nowych pochodnych nukleozydowych stanowi ważne i bardzo interesujące osiągnięcie. Nie sposób ich wszystkich wymienić, bo rzeczywiście ich liczba jest pokaźna. To bardzo dobry przykład badań z obszaru chemii medycznej.

Cele pracy doktorskiej zostały osiągnięte, a sama rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Naturalnie, w tak obszernym tekście, pojawiają się różne, zazwyczaj drobne pomyłki, których nie udało się uniknąć.

Moja uwaga ogólna dotyczy też dyskusji wyników analiz właściwości biologicznych. Omawianie szczegółów tych badań przy każdej grupie otrzymanych związków niewiele wyjaśnia. Natomiast zebranie analiz właściwości biologicznych w odrębnym podrozdziale Dyskusji wyników i ich omówienie, mogłoby się stać podstawą do wyciągnięcia ogólniejszych wniosków.

Na zakończenie chciałbym powiedzieć, że powyższe uwagi nie obniżają mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej mgr Aleksandry SINGH. Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem metod syntetycznej chemii organicznej, ze szczególnym uwzględnieniem chemii kwasów nukleinowych. Dyskusja ciekawych wyników poddanych wcześniej krytycznej ocenie doprowadziła w efekcie do interesujących ustaleń naukowych o znaczeniu praktycznym.

Reasumując, chciałbym stwierdzić, że uzyskane i przedstawione w pracy doktorskiej wyniki mają wysoką rangę naukową i w mojej ocenie praca doktorska mgr Aleksandry SINGH spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytule naukowym. Przedstawiam Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego i przeprowadzenie publicznej obrony tej pracy.



Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ  
*Instytut Chemii Bioorganicznej*  
*Polska Akademia Nauk*  
*Noskowskiego 12, 61-704 Poznań*  
*tel.: 61 8528503*  
*e-mail: Wojciech.Markiewicz@ibch.poznan.pl*