

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr ANNY WANDY KRAJCZYK pt.
„Nukleozydy 4,5-dipodstawionego 1,2,3-triazolu i ich pochodne
bicykliczne”**

Rozwój cywilizacji prowadzi do coraz lepszego i wygodniejszego stylu życia, jest jednak okupiony zagrożeniami wynikającymi z oderwania się od naturalnego środowiska, do którego organizm ludzki został precyzyjnie dostosowany. Jednym z takich zagrożeń jest wzrastająca wrażliwość na zakażenia drobnoustrojami, wynikająca z wydelikacenia naszych organizmów i, z drugiej strony, „wyhodowania” szczepów odpornych na stosowane leki i antyseptyki. Rosnąca świadomość tych faktów powoduje poszukiwanie środków walki z drobnoustrojami, które działać będą w sposób bardziej wyrafinowany i obciążone będą minimalną liczbą efektów ubocznych. Mechanizm ich działania powinien bazować na znajomości szlaków metabolicznych, które są specyficzne dla drobnoustrojów, a nie występują w organizmie człowieka. Pozwala to mieć nadzieję, że zwalczanie bakterii i wirusów poprzez zaburzanie tych szlaków metabolicznych okaże się zabójcze dla patogena, a nieszkodliwe dla pacjenta. Jednym z obiecujących kierunków poszukiwań takich specyfików jest badanie związków ingerujących w syntezę sideroforów, związków ułatwiających przyswajanie żelaza przez bakterie. Wśród potencjalnych kandydatów na inhibitory enzymów wiążących ATP z pochodną kwasu benzoowego (połączenie to jest niezbędne w biosyntezie sideroforów) wyróżniają się nukleozydowe pochodne triazolu, zwłaszcza 1,2,3-triazolu.

Synteza oraz badanie tych pochodnych jest tematem recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Anny Wandy Krajczyk. Praca powstała w Zespole Chemii Nukleozydów Zakładu Chemii Kwasów Nukleinowych Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w laboratorium kierowanym przez prof. dr hab. Jerzego Boryskiego. Wspomniany zespół i jego kierownik mają na koncie liczne osiągnięcia z tej dziedziny chemii, będące owocem wieloletnich badań. Praca badawcza mgr Krajczyk jest elementem dobrze rozwiniętego projektu badawczego i wpisuje się w tematykę zespołu.

Dysertacja przygotowana jest w ogólnie przyjętej formie i jest podzielona na

rozdziały:

- wprowadzenie i część literaturową, liczące razem 45 stron,
 - cel pracy przedstawiony na 2 stronach oraz
 - obszerne omówienie badań własnych, zajmujące 84 strony. Omówienie to posumowane jest we wnioskach końcowych, zawierających wypunktowane osiągnięte rezultaty badawcze (nieco ponad 2 strony). Następuje dalej
 - dokładny opis przeprowadzonych doświadczeń i syntez zajmujący 70 stron.
- Ostatnią częścią pracy jest spis odnośników literaturowych (134 pozycje). W skład pracy wchodzi też, co naturalne, spis treści, zwyczajowe podziękowania oraz wykaz stosowanych skrótów. Załączono też płytę CD z tekstem pracy w wersji elektronicznej oraz plikiem zawierającym pracę opublikowaną w *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, której mgr Krajczyk jest współautorem. Nie rozumiem, dlaczego mgr Krajczyk oprócz opublikowanej pracy nie zamieściła spisu komunikatów wygłoszonych na konferencjach. Stanowią one również dorobek, którego nie należy ukrywać.

Ocenę pracy rozpocznę od części literaturowej, która najpierw wprowadza czytelnika w złożone zagadnienia mechanizmów aktywności przeciwwirusowej omówione na przykładzie jednego z leków nukleozydowych – rybawiryny. Aczkolwiek wspomniane zagadnienia są tylko zasygnalizowane, takie podejście wydaje się słuszne, gdyż tematem pracy nie jest studiowanie tych mechanizmów, a „saga o rybawirynie” uświadamia jak wielowątkowe i złożone problemy związane są z poszukiwaniem aktywnych związków przeciwdrobnoustrojowych, oraz, że jedynym pewnym sposobem ich oceny jest ich otrzymanie na drodze syntezy i poddanie wielokierunkowym badaniom. Uzasadnia to potrzebę wykonania prac, które stały się tematem dysertacji. Główna część rozdziału pierwszego to przedstawienie metod syntezy pochodnych 1,2,3-triazolu, oraz bardziej dogłębne omówienie metod użytych przez kandydatkę – reakcji sprzęgania katalizowanego metalami przejściowymi, reakcji cyklizacji prowadzących do układów bicyklicznych oraz tworzenia pochodnych salicylo-AMP.

Uważam, że część literaturowa jest napisana jasno, z właściwym wyważeniem proporcji między szczegółowością opisu, a zakresem omówionych zagadnień. Dobrze wprowadza w zagadnienia dotyczące badań przeprowadzonych w ramach dysertacji.

Cel pracy, przedstawiony jako następny rozdział, logicznie wynika z poruszonych w części literaturowej opisów syntez i zasygnalizowanych nierozwiązanych pytań i problemów badawczych. Składają się na niego następujące zagadnienia

- synteza halogenopochodnych 4-podstawionego rybonukleozydu 1,2,3-triazolu
- reakcje sprzęgania tych halogenopochodnych z aryłowymi alkinami (również otrzymywanymi przez kandydatkę)
- reakcje cyklizacji prowadzące do pochodnych 8-aza-3-deazaadenozyny i inozyny
- wykorzystanie otrzymanych pochodnych nukleozydowych do syntezy analogów salicylo-AMP
- badania spektrofotometryczne otrzymanych związków (szczególnie badania fluorescencji)
- określanie aktywności biologicznej połączeń otrzymanych w trakcie syntez

Autorka systematycznie relacjonuje przebieg syntez, wyjaśnia jak starała się modyfikować i optymalizować procedury, by osiągnąć zadowalające rezultaty. W ogromnej większości przypadków cel syntetyczny został osiągnięty. Bywało, że zadowalająca wydajność reakcji pojawiała się, jako efekt kilkukrotnych prób i modyfikacji sposobu prowadzenia syntezy. Dotyczy to zwłaszcza badania reakcji alkinyłowania prowadzącej do przyłączenia do pierścienia triazolu atomów koniecznych do budowy drugiego pierścienia sześciocząłowego. Alkinyłowanie to dokonywane było metodą Sonogashiry przy katalizie kompleksami palladu. Jak słusznie zauważyła autorka, nie istnieje w zasadzie jedna typowa procedura Sonogashiry, a jedynie ogólny schemat syntezy, zaś poszczególne zmienne układu reakcyjnego należy za każdym razem dopasowywać do konkretnych substratów. Mgr Krajczyk przeprowadziła 12 różnych wersji tej reakcji na układzie modelowym, w którym substratami były: nukleozyd 4-cyjano-5-jodo-1,2,3-triazolu i fenyloacetylen. Nie były to badania bezzasadne, gdyż w pozornie niewiele się różniących warunkach wydajność reakcji oscylowała od 18 do 75%. Wybór optymalnej metody nie oznaczał jeszcze rozwiązania problemu, gdyż wydajności nadal były zmienne i zależały od natury kolejnych substratów alkinowych. Te szczegółowe i zróżnicowane próby pozwoliły na sformułowanie pewnych uogólnień (zebranych na stronie 79 pracy i zapewne słusznych w tej ograniczonej grupie reagentów), które były przydatne przy wyborze warunków dalszych syntez. Doprowadziły one do uzyskania (z wydajnościami dobrymi lub zadowalającymi, a w jednym przypadku – podstawnik 4-NO₂ – z wydajnością dostateczną) siedmiu nowych 5-arylowych pochodnych nukleozydu 1,2,3-triazolu.

Pochodne te posłużyły jako substraty kolejnej reakcji – cyklizacji do układu 8-aza-3-deazapuryny, a więc docelowych pochodnych imitujących adenozyne oraz inozyne. Ten etap syntez przebiegał ze znacznie lepszymi wydajnościami (czasem praktycznie ilościowymi). Czynnikiem nukleofilowym i zarazem zasadowym w tych cyklizacjach była cząsteczka amoniaku. W przypadku pochodnej alkinylofenylowej reakcję przeprowadzono też z użyciem cyklopropyloaminy w miejsce amoniaku. Ogólnie rzecz biorąc reakcja przebiegała podobnie, z tym, że wydzielono znaczne ilości produktu addycji aminy, który jest postulowanym produktem pośrednim cyklizacji według jednego z proponowanych mechanizmów. Ten wynik zasługuje moim zdaniem na głębsze zbadania i dokładniejsze studia mechanistyczne (co nie było głównym celem prowadzonych prac).

Uzyskane pochodne sulfamoylowano na grupie 5'OH, wykorzystując typową metodę syntezy, a pochodne sulfamoylowe sprzęgano z kwasem salicylowym z wykorzystaniem metody Alricha (czynnikiem kondensującym był karbonylodiiimidazol). Doprowadziło to do uzyskania docelowych połączeń, potencjalnych inhibitorów enzymów grupy AAAE. We współpracy ze specjalistycznym laboratorium określono ich aktywność, stwierdzając niewielką aktywność jednego ze związków wobec wirusów FLUAV, FLUBV, RSV oraz PIV-3.

Uzyskane końcowe produkty mgr Anna Krajczyk scharakteryzowała spektrofotometrycznie, mierząc ich widma w zakresie UV oraz określając parametry

fluorescencyjne. Znajomość tych właściwości może się okazać istotna podczas wykonywania dalszych badań biochemicznych. Wykazane zostały dość silne właściwości fluorescencyjne otrzymanych układów bicyklicznych w roztworach metanolowych i jednocześnie stwierdzono silne tłumienie fluorescencji w układach wodnych.

W podsumowaniu wyników Autorka jasno i precyzyjnie wymienia osiągnięte rezultaty, odnosi się do niepowodzeń i słusznie podkreśla potencjalne duże znaczenie poczynionych ustaleń badawczych.

Część eksperymentalna jest bardzo szczegółowa, eksperymenty są skrupulatnie opisane w sposób, który moim zdaniem zapewnia, że wyniki dadzą się powtórzyć przez każdego sprawnego chemika-organika.

Praca napisana jest w sposób jasny, klarownym językiem i mimo szczegółowości nie nuży przy czytaniu. Korekta jest bardzo staranna, udało mi się dostrzec zaledwie cztery „literówki” w całym tekście, co jest wynikiem doskonałym. Niestety dotyczy to tylko tekstu, dużo częściej błędy zdarzają się w ilustracjach, co jest o tyle istotne, że błąd w dłuższym zdaniu jest łatwy do rozpoznania i najczęściej nie zmienia sensu, natomiast w opisie schematu, a zwłaszcza we wzorze chemicznym brak jednej litery czasem wiele znaczy (np. na rysunku 36 brak litery C zmienia aceton w eter dimetylowy).

Oznaczenia struktur otrzymywanych związków są najczęściej oparte na analizie widm magnetycznego rezonansu jąder wodoru i izotopu ^{13}C . Nie budzą one moich wątpliwości, jednak np. pojawienie się grupy cyjanowej można byłoby poprzeć także widmem IR. Brakowało mi pełniejszego opisu widm NOESY produktu **83**, a najchętniej zobaczyłbym je na ilustracji. Szkoda, że nie pokuszono się o oznaczenie metodą rentgenowską struktur niektórych związków dobrze krystalizujących. Byłoby to zwłaszcza ciekawe w przypadku produktu addycji cyklopropyloaminy, gdzie analiza NMR nie była w stanie rozstrzygnąć izomerii *E*, *Z*. Co prawda związek ten nie jest krystaliczny, ale jako amina powinien łatwo dać się przeprowadzić w krystaliczną sól. Podsuwam ten pomysł, jako ewentualność dalszych badań.

Nie wiem też, dlaczego Autorka uważa, że nie można prowadzić reakcji w ciekłym amoniaku w reaktorze stalowym, którym dysponowała. Zresztą roztwór amoniaku w DME, nasycony w temperaturze poniżej -33°C , jest w istocie mieszaniną ciekłego amoniaku i DME, więc po prawdzie „niechcący” reakcję w ciekłym amoniaku prowadzono.

Powyższe pytania i wątpliwości wynikają z konieczności krytycznej oceny, do jakiej zobowiązany jest recenzent. Ich ranga jest niepomrotnie mniejsza od wysokiej oceny merytorycznej przedstawionych badań, stanowiących przykład pokaźnej porcji bardzo solidnej i wnikliwej pracy laboratoryjnej, przeprowadzonej z dużym kunsztem, znajomością metodyki oraz według dobrze przemyślanego i konsekwentnie realizowanego planu. Zastosowany warsztat badawczy i sposób przedstawienia wyników dowodzi dużej biegłości doświadczałnej i znajomości nowoczesnej chemii organicznej. Postawiony na początku cel pracy był jasno sformułowany, dobrze uzasadniony, posiada dużą wagę naukową i wiele elementów nowości. Cel ten został

osiągnięty.

Uznaję, że recenzowana praca w zupełności spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami i z całym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie mgr Anny Wandy Krajczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 28 sierpnia 2015



Prof. UAM dr hab. Jan Milecki