



UNIVERSITY OF GDAŃSK



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, tel. 58 523 50 20, e-mail: zbigniew.kaczynski@ug.edu.pl

dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG  
Pracownia Biochemii Strukturalnej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 12 września 2014

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Walczewskiej pt.  
Synteza i właściwości biologiczne *N*-podstawionych pochodnych  
*O*<sup>3</sup>-(2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozylo)diosgeniny

Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Cukrów pod opieką śp. prof. dr. hab. Andrzeja Wiśniewskiego i prof. UG, dr hab. Beaty Liberek (od stycznia 2014), przy współpracy z dr. Henrykiem Myszka.

Saponiny są związkami, które zawierają w swojej strukturze część aglikonu (sapogeniny) i glikonu (cukru). Ich nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *sapo*, oznaczającego mydło, co związane jest z właściwościami do tworzenia piany w kontakcie tych substancji z wodą. Część cukrowa saponiny zbudowana jest z 1-5 monosacharydów, natomiast aglikon ma charakter sterolowy lub trójterpenowy. Z farmaceutycznego punktu widzenia jedną z najważniejszych sapogenin steroidowych jest diosgenina. Wykazuje ona właściwości przeciwzapalne oraz aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek nowotworowych, ale co najważniejsze jest bardzo dogodnym półproduktem do syntezy kortykosteroidów i hormonów płciowych.

Saponiny wykazują właściwości pieniące i emulgujące, właściwości farmakologiczne, lecznicze i hemolityczne, jak również właściwości cytotoksyczne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i owadobójcze. Szczególnie aktywność cytotoksyczna i właściwości antyseptyczne budzą duże nadzieje, ponieważ saponiny stanowią jedną z alternatywnych grup związków o potencjalnych możliwościach

zastosowania zarówno w terapii przeciwnowotworowej, jak i w terapii przeciwbakteryjnej w związku z szybko wzrastającą liczbą szczepów bakterii opornych na antybiotyki.

Saponiny izolowane są głównie z roślin jednoliściennych. Proces wyodrębniania jest utrudniony ze względu na ich stosunkowo niewielką zawartość oraz konieczność stosowania wieloetapowych procesów i różnych technik separacyjnych do otrzymania czystych związków. Alternatywę stanowi synteza chemiczna, która nie tylko umożliwia otrzymywanie większych ilości czystych związków, ale pozwala na otrzymywanie nowych pochodnych, często o „lepszych” właściwościach biologicznych.

Biorąc pod uwagę powyższy wstęp należy jednoznacznie stwierdzić, że tematyka badawcza podjęta przez mgr. Walczewską jest jak najbardziej aktualna i potrzebna.

Rozprawa doktorska zajmuje 95 stron i została podzielona w sposób typowy dla prac z zakresu nauk przyrodniczych.

W rozdziale *Część literaturowa* Doktorantka przedstawiła szczegółowy opis wiązań glikozydowych, metod syntezy glikozydów, antybiotyków aminoglikozydowych oraz lekooporności.

W rozdziale *Cel pracy* Kandydatka krótko opisała budowę i biologiczne właściwości saponin steroidowych, w których hydrofobowy aglikon stanowi diosgenina oraz sprecyzowała szczegółowe cele planowanych badań.

Rozdział *Część doświadczalna* może być umownie podzielona na trzy części. W pierwszej z nich Mgr Walczewska ogólnie opisała przygotowanie odczynników, techniki chromatograficzne wykorzystywane do monitorowania przebiegu reakcji oraz wydzielenia i oczyszczania otrzymanych związków, a także techniki spektroskopowe (IR, MS, NMR) i optyczne (polarymetria) wykorzystywane do potwierdzenia/ustalenia struktury chemicznej otrzymanych pochodnych. W drugiej części Doktorantka szczegółowo opisuje procedury syntezy i oczyszczania poszczególnych pochodnych, natomiast w trzeciej - badania biologiczne, przeprowadzone na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz w Instytucie Chorób Zakaźnych i Zdrowia Publicznego w Ankonie (Włochy), którym zostały poddane otrzymane pochodne diosgeniny.

W rozdziale zatytułowanym *Dyskusja wyników* Doktorantka szczegółowo opisuje interpretację widm IR, NMR i MS, wykorzystanych do potwierdzenia/ustalenia struktury wszystkich otrzymanych pochodnych:

- 1,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-2-deoksy-2-(3,4,5,6-tetrachloroftalimido)- $\alpha,\beta$ -D-glukopiranozy (3)
- Bromek 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-tetrachloroftalimido- $\alpha,\beta$ -D-glukopiranozyłu (4)
- Chlorek 3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-tetrachloroftalimido- $\beta$ -D-glukopiranozyłu (5)
- O*<sup>3</sup>-(3,4,6-tri-*O*-acetylo-2-deoksy-2-tetrachloroftalimido- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (6)
- O*<sup>3</sup>-(2-amido-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (7)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-etyloureido- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (8)
- O*<sup>3</sup>-(2-acetamido-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (9)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (10)
- Chlorowodorek *O*<sup>3</sup>-(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (11)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-dimetyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (12)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-etyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (13)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-dietyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (14)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-propyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (15)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-dipropyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (16)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-dibutyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (17)
- O*<sup>3</sup>-[2-deoksy-2-di(3-metylobutylo)amino- $\beta$ -D-glukopiranozylo]diosgeniny (18)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-pentyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (19)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-heksyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (20)
- O*<sup>3</sup>-(2-deoksy-2-diheksyloamino- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (21)

Interpretacja zarejestrowanych widm oraz zestawienie w formie tabelarycznej odczytanych z nich parametrów (przesunięcia chemiczne, stałe sprzężenia, masy cząsteczkowe) nie budzą większych zastrzeżeń. Ponadto w części tej, Kandydatka omawia istotne zagadnienia związane z syntezą i otrzymanymi pochodnymi np. wybór grupy ochronnej, mechanizm reakcji glikozylowania, wydajność reakcji, określenie konfiguracji anomerycznej, czy ustalenie konformacji pierścienia cukrowego.

Bardzo ciekawym fragmentem pracy doktorskiej jest opis wyników badań biologicznych. Okazało się, że spośród otrzymanych pochodnych najsilniejsze działanie przeciwgrzybicze wykazuje związek 11 (chlorowodorek) oraz pochodne 12 (*N,N*-dimetylowa), 13 (*N*-etylowa), 14 (*N,N*-dietylowa), 15 (*N*-propylowa) i 16 (*N,N*-dipropylowa). Praktycznie te same związki (z wyjątkiem 14) wykazują silne działanie

przeciwbakteryjne względem referencyjnych bakterii Gram-dodatnich. Natomiast nie stwierdzono praktycznie żadnej aktywności biologicznej względem szczepów referencyjnych bakterii Gram-ujemnych. Ponadto w wyniku badań chlorowodoru (11) względem tzw. szczepów bakterii klinicznych, stwierdzono, że w wielu przypadkach wykazuje on aktywność porównywalną, a w niektórych przypadkach nawet lepszą od powszechnie stosowanych antybiotyków.

Rozdział *Podsumowanie* uwypukla najistotniejsze osiągnięcia rozprawy - otrzymanie szeregu ww. pochodnych diosgeniny, z których kilka wykazuje bardzo wysoką aktywność przeciwbakteryjną (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim) i przeciwgrzybiczną. Doktorantka trafnie konkludując ten rozdział stwierdzeniem dotyczącym zsyntezowanych związków, które przytaczam w wersji skróconej: „stanowią one dobrą matrycę do konstrukcji efektywnych... preparatów przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych”.

Rozprawę kończy rozdział *Literatura cytowana* obejmująca 169 pozycji.

Praca jest bardzo starannie i przejrzyście przygotowana pod względem językowym i edytorskim, aczkolwiek Doktorantka nie ustrzegła się kilku usterek.

- W nawiązaniu do zacytowanego powyżej fragmentu rozdziału *Podsumowanie* „stanowią one dobrą matrycę do konstrukcji efektywnych i bezpiecznych preparatów przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych” nasuwa się pytanie – jak należy rozumieć sformułowanie „bezpiecznych preparatów”?
- Brak konsekwencji w *Wykazie stosowanych skrótów*. Niektóre typowo angielskie skróty wyjaśnione są tylko po polsku (np. MBC, MIC), inne po polsku i angielsku (np. CFU, LG) a jeden z nich tylko w szczątkowej formie angielskiej (MALDI-TOF-MS).
- W pracy brakuje krótkiego, klasycznego *Wstępu*, w którym Doktorantka ogólnie zarysowałaby zakres badań na tle aktualnego stanu wiedzy. Czytelnik, dopiero po zapoznaniu się z wprowadzeniem do rozdziału *Cel pracy* i postawionymi celami szczegółowymi, pojmuje sens zawartości rozdziału *Część literaturowa* i planowanych badań. Moim zdaniem uproszczone wprowadzenie do rozdziału *Cel pracy* byłoby doskonałym wstępem do całej pracy.
- Brak konsekwencji w cytowaniu odnośników literaturowych w tekście. Przykładowo na str. 12 w odnośniku 13 jest Plusquellec i wsp., a powinno być

Ferrieres i wsp. (podaje się pierwszego autora). Z kolei na str. 20 jest już prawidłowo – Hanessian i wsp. oraz Woodward i wsp. Na str. 16 w odnośniku 28 jest Hotha i wsp., a powinno być Sureshkumar i Hotha, podobnie na str. 28 Danishefsky i Bilodeau (jeżeli jest dwóch autorów to podaje się obu). Na str. 33 odnośnik 110 jest inny niż w rozdziale *Literatura cytowana*.

- Dlaczego do badań biologicznych na szczepach klinicznych bakterii wykorzystano tylko związek 11, pomimo tego, że dla kilku innych pochodnych uzyskano również bardzo obiecujące wyniki badań na szczepach referencyjnych?
- W rozdziale *Dyskusja wyników* wszystkie litery D oznaczające przynależność do szeregu konfiguracyjnego powinny być pisane „małymi wielkimi literami” (mniejszą czcionką).
- Czy możliwe jest, żeby przesunięcia chemiczne atomów węgla  $^{13}\text{C}$   $\alpha$  i  $\beta$  anomerów związku 3 były takie same? (str. 58 – tabela 4.4 oraz wiersze 4-5).
- Dobrze byłoby podać przesunięcia chemiczne wszystkich protonów diosgeniny przynajmniej dla jednej otrzymanej pochodnej np. związku 6 (strona 63-64), podobnie jak zrobiono dla przesunięć chemicznych wszystkich atomów węgla tego związku.
- Czy przesunięcia chemiczne atomów węgla grup  $\text{CH}_2$  połączonych bezpośrednio z atomem azotu w związkach 17-21 nie są przesunięte w kierunku wyższych wartości przesunięć chemicznych? Taką prawidłowość zaobserwowano dla związków 13-16! (str. 75, przedostatni akapit).
- Drobne uwagi, m.in. na str. 9 skrót dla reszty glukozy powinien być Glc zamiast Glu; na str. 20 powinno być Woodward; na str. 26 w odnośniku 69 powinno być Friesen’a i Danishefsky’ego; na str. 38 powinno być ewerninomycyna; na str. 45 bezpieczniej użyć „spektrometru mas” zamiast „spektrometru masowego”; na str. 48 zamiast „punkt 3.5a” powinno być „punkt 3.5.1” na str. 68 i 71 „widmo/widma mas” zamiast „widmo/widma masowe”; str. 88 punkt. 1 - uzyskano tylko  $\beta$  anomer chlorku.

Wszystkie powyższe uwagi mają przede wszystkim charakter dyskusyjny i nie pomniejszają wartości poznawczej i potencjalnie aplikacyjnej rozprawy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o pochodnych diosgeniny i ich potencjalnym przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybicznym wykorzystaniu. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa, które jest prawidłowo wykorzystane, opanowała wiele metod syntezy, sprawnie posługuje się technikami separacyjnymi i spektroskopowymi, jako narzędziami niezbędnymi do wyizolowania otrzymanych pochodnych a następnie określenia ich struktury chemicznej. Dowodzi to swobodnego poruszania się w omawianych zagadnieniach i dobrego opanowaniu warsztatu badawczego.

Na dorobek mgr Agaty Walczewskiej składa się 1 artykuł opublikowany w czasopiśmie z listy JCR, 2 artykuły opublikowane w materiałach pozjazdowych (Na Pograniczu Chemii i Biologii) oraz 7 doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Reasumując, przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku) oraz zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim.

Wnioskuje do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Agaty Walczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z-Walczewska