



# INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Profesor Sławomir Jarosz

01-224 Warszawa  
ul. Kasprzaka 44/52  
Tel. (22) 343 23 20  
Fax.: (22) 632 66 81  
E-mail: slawomir.jarosz@icho.edu.pl

Warszawa, 15.02.2019

## Recenzja pracy doktorskiej mgr Darii Magdaleny Grzywacz pt.

*”Synteza i właściwości N-acylowych pochodnych 2-amino-2-deoksy-  
β-D-glukopiranozydu diosgenylu”*

wykonanej w Pracowni Glikochemii Organicznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego  
pod kierunkiem dr hab. Beaty Liberek  
promotor pomocniczy: dr Henryk Myszka

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej były współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach projektu POIG.01.01.02-14-102/09-06: *„Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej”*

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Darii Grzywacz ma charakter klasyczny i składa się z części literaturowej (55 stron), krótkiego rozdziału przedstawiającego cel pracy (1,5 strony; ten rozdział moim zdaniem powinien znaleźć się na początku rozprawy a nie po ‘części literaturowej’) i omówienia wyników własnych, obejmujących zarówno syntezę związków jak ich badania biologiczne. W tej części znalazły się również tabele widm MS i NMR, które przecież powinny być umieszczone w następnym rozdziale „część doświadczalna”. Rozprawę zamyka podrozdział podsumowujący wyniki uzyskane przez doktorantkę oraz jej dorobek naukowy i spis cytowanej literatury (197 pozycji). Na samym początku tej pracy znajdujemy aneks zatytułowany: ‘spis użytych skrótów’. Taki przypis jest bardzo przydatny, jednakże autorka nie powinna podawać tak oczywistych skrótów jak np. benzyl (Bn), benzoil (Bz), DMF (dimetyloformamid), czy też HSQC, lub HSBC. Tych ‘*oczywistych oczywistości*’ jest tu, niestety, zdecydowanie więcej.

Cel pracy (podany dopiero na str. 75, po części literaturowej) dotyczy poszukiwania semi-syntetycznych pochodnych z grupy saponin, które mogą posiadać interesujące właściwości biologiczne. Saponiny są to glikozydy zbudowane z dwóch części: hydrofobowego aglikonu (sapogeniny) oraz hydrofilowej części cukrowej. Wykazują one działanie przeciwdrobnoustrojowe i stanowią doskonałą podstawę do projektowania nowych substancji czynnych. W zależności od rodzaju sapogeniny, saponiny dzielimy na trzy typy: triterpenoidowe, steroidowe, oraz zasadowe steroidowe. Saponiny wykazują



zdolność obniżania napięcia powierzchniowego roztworów wodnych; pienią się w wodzie jak mydło. W przeszłości, rośliny bogate w saponiny stosowano jako namiastkę mydła.

Doktorantka postanowiła zająć się w swojej pracy doktorskiej glikozydami (konkretnie pochodnymi glukozydami) diosgeniny. Plan badawczy doktorantki obejmował przeprowadzenie syntez glikozaminosydów diosgeniny, zbadanie ich aktywności biologicznej, oraz określenie profilu SAR (*Structure Activity Relationship*).

W części literaturowej Doktorantka opisuje naturalne saponiny, ich występowanie, właściwości oraz metody ich otrzymywania. Autorka opisuje również wyczerpująco aktywność przeciwbakteryjną takich związków wyrażającą się m.in. hamowaniem wzrostu bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Odnoszę wrażenie, że Doktorantka chwilami podaje jednak nadmiar szczegółowych informacji. Dużo miejsca – co nie jest dziwne, bowiem dotyczy to bezpośrednio pracy doktorskiej – mgr Grzywacz poświęca saponinom steroidowym, ich budowie i stereochemii.

Dlaczego zainteresowania Doktorantki skupiły się na diosgeninie jako składniku saponinowym? Otóż – jak zaznacza na str. 51 i dalszych – diosgenina znana jest z właściwości przeciwzapalnych i przeciwutleniających i może być wykorzystana w leczeniu wielu chorób. Wykazuje aktywność antyproliferacyjną wobec komórek różnego typu raka (np. raka żołądka czy przewlekłej białaczki szpikowej). Jest także bardzo cennym półproduktem w przemyśle farmaceutycznym, wykorzystywanym m.in. do otrzymywania progesteronu na skalę przemysłową. Na str. 52 (Rys. 24) Doktorantka przedstawia schematycznie różnorodną aktywność biologiczną diosgeniny (dokumentowaną w odn. [128]). Jak widać, znaczenia diosgeniny nie można przecenić; wykazuje ona aktywność cytotoksyczną, działa na układ odpornościowy, wpływa na procesy metaboliczne, czy poziom glukozy we krwi. Jak zaznacza Doktorantka na str. 53 (rozdz. 1.4.3.) glikozydy, w których aglikon stanowi diosgenina, są najliczniejszą grupą naturalnych saponin steroidowych. Na kolejnych stronach mgr Grzywacz omawia naturalne saponiny na bazie diosgeniny, ich występowanie, właściwości i zastosowanie. Chemiczna synteza takich saponin polega na utworzeniu wiązania glikozydowego pomiędzy akceptorem glikozydu (tu diosgeniną) oraz donorem glikozydu (np. bromkiem glikozylowym). W reakcji glikozydowania może powstawać mieszanina anomerów  $\alpha/\beta$ ; należy zatem tak prowadzić przemianę aby otrzymać jeden z izomerów z jak najwyższą stereoselektywnością. Obecnie istnieją metody pozwalające na syntezę pożądanego anomeru, jednak w przypadku bardziej złożonych cząsteczek selekcja może nie być zadowalająca. W rozdziale 1.5.1. Doktorantka przedstawia znane literaturowo strategie syntezy saponin przy zastosowaniu 'klasycznych' donorów glikozylowych: halogenków, tioglikozydów oraz imidanów. Lektura tego, nieco zbyt rozbudowanego rozdziału, stanowi dobre wprowadzenie w badania własne Doktorantki.

Opis badań własnych Doktorantki zaczyna się na str. 78. Plan syntetyczny recenzowanej pracy przedstawiał się następująco: 1) synteza donora glikozylowego z D-glukozydaminy; 2) reakcja jego sprzęgania z diosgeniną; 3) usunięcie osłon w tak przygotowanym glikozaminosydzie diosgeniny. Jest to przedstawione w Schemacie 21 na str. 21.



Opis jednak pierwszych przemian prowadzący do związku **2** lub **7** (atom azotu jest zabezpieczony grupą NCTP lub NHTroc) jest niezbyt jasny i dopiero po dłuższej analizie można dojść do wniosku, że warunki **a**<sub>1</sub> dotyczą analogu **2** (atom azotu zabezpieczony grupą TCP) a **a**<sub>2</sub> związku **7** (blok Troc).

Po pomyślnej syntezie zabezpieczonych peracetylowanych pochodnych glukozaminy (**2** i **7**) Doktorantka przeprowadziła je w odpowiednie bromki glikozyłowe działaniem czterobromku tytanu.

Co ciekawe, doktorantka zaobserwowała zarówno anomer  $\alpha$ - jak i  $\beta$ - związku **3**, co udokumentowane jest obecnością odpowiednich sygnałów w widmie <sup>1</sup>H NMR (str. 80;  $\delta = 6,26$  ppm d;  $J = 3,6$  Hz, oraz  $\delta = 6,46$   $J = 8,8$  Hz). Powstawanie izomeru  $\beta$ - jest raczej nieoczekiwane, gdyż - ze względu na bardzo silny efekt anomeryczny - zwykle tworzy się wyłącznie  $\alpha$ -bromoglukoza. Za obecność  $\beta$ -bromku odpowiada prawdopodobnie efekt steryczny wynikający z obecności bardzo dużego podstawnika na atomie azotu. Bromek **7** natomiast (niezbyt rozbudowana przestrzennie grupa Troc na atomie azotu) był czystym anomerem  $\alpha$ -, co wydaje się potwierdzać tę hipotezę. Doktorantka tylko przytacza te dane choć powinna również opatrzyć je krótkim komentarzem.

Kluczowa reakcja syntezy saponin diosgenylowych polegała na glikozydowaniu diosgeniny odpowiednim bromkiem (**3** lub **8**). W obu przypadkach powstawały oczekiwane glikozydy o konfiguracji  $\beta$ - z bardzo dobrymi wydajnościami (80 i 83%). Kolejny etap to usunięcie grup ochronnych. I tak potraktowanie obu związków hydrazyną prowadzi do w pełni odblokowanej pochodnej **5** natomiast usunięcie grupy ochronnej z atomu azotu z pozostawieniem grup octanowych ( $\rightarrow$  **10**) jest dokonane w warunkach redukcyjnych (Zn-Cu, AcOH).

Po pomyślnej syntezie glikozydu diosgenyłu **5**, Doktorantka przystąpiła do realizacji finalnego etapu, tj. syntezy *N*-chronionych pochodnych 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozyłu diosgeniny (**11-21**). Polegał on na reakcji w pełni odblokowanego glikozydu diosgeniny **5** z różnymi aminokwasami (glicyną, sarkozyną, L- i D-alaniną, L-seryną, L-treoniną, L-proliną, L-metioniną, L-lizyną, oraz dipeptydem L-Ala- L-Ala). Większość z tych aminokwasów była chroniona grupą Fmoc. Reakcję prowadzono w obecności środków sprzęgających, z których najlepszy okazał się HOBt. Po usunięciu zabezpieczenia Fmoc, Doktorantka otrzymała docelowe modyfikowane saponiny **22-31** z odblokowanymi wszystkimi grupami funkcyjnymi. Otrzymała również pochodne, w których atom azotu części glukozaminowej był podstawiony nie aminokwasami a hydroksykwasami (związki **32-34**).

Na stronach 91-94 opisane są nieudane próby funkcjonalizacji 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozyłu diosgenyłu (**5**) na atomie azotu, przez sprzęganie z pochodnymi kwasów glukonowych (np. kwasu **38**). Udało się jednak zrealizować tę przemianę jeśli w miejsce odbezpieczonego glikozydu **5** użyto jego per-acetylowej pochodnej **8**. Jednak autorka nie mogła przeprowadzić deprotekcji tego związku gdyż otrzymała go w bardzo niewielkich ilościach.

Badania biologiczne zostały wykonane dla wyjściowego chlorowodoru glukozamidu diosgenyłu, jedenastu pochodnych aminokwasowych (**14**, **22-31**) oraz trzech pochodnych *N*-hydroksy-kwasowych (**32-34**) na dziesięciu szczepach referencyjnych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także na dwóch szczepach referencyjnych grzybów.



Doktorantka przedstawia szczegółowo wartości MIC (Tabela 15 str. 98) oraz aktywność hemolityczną (wykres 1; str. 99). Te badania – jak przypuszczam – były wykonywane nie przez autorkę (co jest absolutnie zrozumiałe), gdyż ten rozdział jest pisany w formie bezosobowej ('badania zostały wykonane' itp.).

Na podstawie otrzymanych wyników badań biologicznych Doktorantka stwierdziła, że nieaktywne wobec bakterii Gram-dodatnich są pochodne, w których do atomu azotu glukozaminy zostały przyłączone acetyloglicyna (**14**), dipeptyd L-ala-L-ala oraz kwas glikolowy, L-mlekowy i L-glicerynowy (**32-34**). Natomiast najwyższą aktywność wobec tych bakterii wykazywały pochodne **23**, **25**, **26**, **29** i **30**. W konkluzji tego rozdziału Doktorantka zaznacza, że wydłużenie łańcucha podstawnika aminowego nie jest korzystne dla działania przeciwdrobnoustrojowego. Wyjątkiem jest pochodna **30** wykazująca wysoką aktywność mikrobiologiczną; niestety, jest ona silnie toksyczna.

Część eksperymentalna rozpoczyna opis syntez pochodnych glukozaminy tj. półproduktów użytych później w syntezie saponin (związki **1a**, **2** i **3**). Opis jest dokładny, jednakże Doktorantka nie podaje żadnych danych pozwalających potwierdzić strukturę otrzymanych półproduktów. Oczywiście są one znane i 'używane na co dzień' w jej laboratorium ale warto by podać odnośnik literaturowy opisujący te pochodne.

Otrzymany bromek glikozyłowy **3**, Doktorantka poddała katalizowanej przez triflan srebra reakcji z diosgeniną otrzymując N-blokową saponinę **4**. Po usunięciu grup blokujących za pomocą hydrazyny powstawała całkowicie odblokowana saponina **5**, która następnie została poddana reakcji z różnymi aminokwasami co doprowadziło do związków **11-21** str. 132 i następne). Usunięcie grup blokujących atom azotu w części aminokwasowej doprowadziło do związków **22-34**. Doktorantka w sposób dość wybiórczy charakteryzuje produkty tych reakcji. Saponiny w formie blokowanej (związki **11-21**) są scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas; nie znalazłem widm NMR dla tych związków (z wyjątkiem związku **14**). Saponiny w formie nieblokowanej (związki **22-34**) mają już pełną charakterystykę widmową. Nie znalazłem ani jednego wyniku analizy elementarnej co nie pozwala mi wysnuć wniosku na temat czystości produktów (tym bardziej, że brak jest również skanów widm NMR). Mimo, iż związki są (a przynajmniej powinny być) optycznie czyste nie podano również oznaczeń skręcalności właściwej.

Tabela 18 prezentująca dane widm MS (str. 105; rozdział **3.5**) zawiera nieprawidłowe dane. Autorka myli dwie różne rzeczy. Masa rzeczywista związku uwzględnia izotopy (ściślej: zawartość izotopową) pierwiastków i nie jest tożsama z masą mierzoną w spektrometrii mas! Tu uwzględniamy wyłącznie struktury izotopowo czyste, zawierające atomy:  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , oraz  $^{14}\text{N}$ . Przykładowo, związek **16** o wzorze sumarycznym  $\text{C}_{51}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{10}$  ma rzeczywiście masę 869,11 (obliczoną a nie jak pisze Doktorantka teoretyczną), ale nie można jej porównywać z masą zmierzoną w spektrometrii mas!. Tu bowiem trzeba uwzględnić masę związku izotopowo czystego  $^{12}\text{C}_{51}^1\text{H}_{68}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}_{10}$  (868 D). Tylko wtedy dane podawane przez Doktorantkę są spójne. Zaobserwowane przez nią sygnały ( $m/z$ ) = 869,4; 891,4; oraz 907,4 odpowiadają jonom: M+H; M+Na; M+K; te moje uwagi dotyczą wszystkich związków

ków **11-21**. Dziwne, że doktorantka nie zwróciła na to uwagi. Wiadomo przecież, że masa (w spektrometrii mas) związków zawierających parzystą liczbę atomów azotu jest parzysta. Co ciekawe następna Tabela (nr 19; str. 106) podaje już prawidłowe masy dla związków **22-34**.

Na stronie 143 autorka opisuje preparatykę otrzymywania związku **24** polegającą na usunięciu zabezpieczeń Fmoc z **13**. Tymczasem narysowane przez nią związki **13** i **24** są identyczne. Jest to typowy błąd komputerowy: autorka zapomniała usunąć grupy Fmoc w skopiowanym wzorze i zastąpić je atomami wodoru.

Doktorantka zrealizowała syntezę kilkunastu saponin diosgenylowych i określiła ich właściwości biologiczne. Osiągnęła ona wartościowe wyniki poszerzające naszą wiedzę w chemii saponin. Choć syntezы wszystkich saponin wyglądają na raczej standardowe to wymagały dużej wiedzy i zręczności manualnej. Podsumowując stwierdzam, że doktorantka wykazała się pracowitością oraz inwencją naukową. Mimo wskazanych błędów oraz uwag polemicznych, pracę mgr Darii Grzywacz oceniam pozytywnie.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszelkie warunki ustawy i wnoszę o dopuszczenie magister Darii Grzywacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

