



Dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. nzw. Pol. Śl.

e-mail: ilona.wandzik@polsl.pl

tel. 32 237 20 28

Gliwice, 05.03.2019

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Grzywacz

*pt Synteza i właściwości N-acylowych pochodnych 2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu diosgenyłu*

wykonanej w Pracowni Glikochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego  
pod kierunkiem promotora **dr hab. Beaty Liberek, prof. UG** oraz promotora pomocniczego  
**dra Henryka Myski**

Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach projektu POIG (POIG.01.01.02-02-14-102/09): Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter tradycyjny i zawiera następujące rozdziały: streszczenie, część literaturową, cel pracy, omówienie wyników, część doświadczalną, dorobek naukowy Autorki i spis literatury. Przedłożona praca zawiera 163 strony, 35 schematów, 26 rysunków, 35 tabel, 197 odnośników literaturowych. Najobszerniejszą częścią rozprawy jest część literaturowa licząca 56 stron. Kolejną, co do wielkości częścią, jest omówienie badań własnych (47 stron, w tym 19 stron z tabelami przedstawiającymi dane spektroskopowe).

Jednostki cukrowe są fragmentami często spotykanymi w naturalnych związkach biologicznie aktywnych. Synteza analogów związków naturalnych i modyfikacja aktywności biologicznej jest tematem badań podstawowych w wielu laboratoriach bioorganicznych. Praca doktorska mgr Darii Grzywacz mieści się w tej tematyce. Badania prowadzone przez Doktorantkę w ramach pracy doktorskiej miały na celu otrzymanie nowych, półsyntetycznych glikozydów diosgenyłu z wykorzystaniem naturalnej diosgeniny jako aglikonu oraz N-acylowych pochodnych D-glukozaminy jako części cukrowej. Związki o takiej strukturze są analogami

naturalnych saponin, powszechnie obecnych w chińskich preparatach ziołowych wykorzystywanych w tradycyjnej medycynie ludowej. Choć w naturalnych saponinach diosgeniny występują różne jednostki cukrowe, to nie ma wśród nich D-glukozaminy. W związku z tym rozwiązanie proponowane przez Autorkę daje z jednej strony możliwość łatwej modyfikacji części cukrowej poprzez acylowanie grupy aminowej jednostki cukrowej, a z drugiej strony istnieje szansa na zachowanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Autorka w ramach badań zajęła się nie tylko syntezą i charakterystyką nowych pochodnych, ale również badaniami aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i hemolitycznej uzyskanych saponin. Autorka podjęła się ciekawego i aktualnego tematu.

Praca była realizowana pod kierunkiem profesor Beaty Liberek i doktora Henryka Myszk. Biorąc pod uwagę bogate doświadczenie tej grupy badawczej w dziedzinie chemii cukrów, a zwłaszcza badań nad syntezą kluczowego substratu: 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydu diosgenyłu, Doktorantka trafiła na bardzo dobry grunt i nie tylko brała udział w dopracowaniu efektywniejszej metodyki syntezy wspomnianego substratu, ale zsyntezowała szereg nowych pochodnych z jego udziałem.

Rozprawa jest napisana zwięzłym i komunikatywnym językiem, co sprawia, że czyta się ją z zainteresowaniem. Moja ocena pracy jest pozytywna, nie znalazłam poważnych błędów merytorycznych, ani metodycznych, niemniej jednak chciałam przedstawić kilka uwag w kolejności takiej jak zostało opisane w przedłożonej rozprawie.

W części literaturowej Autorka opisuje budowę, występowanie i aktywność biologiczną saponin, ze szczególnym uwzględnieniem saponin steroidowych, które zawierają diosgeninę jako aglikon. Informacje przedstawione w tej części pracy podane są w sposób kompaktowy i bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w zagadnienia ogólne. Nie znalazłam jedynie informacji na temat naturalnych saponin zawierających glukozaminę jako jednostkę cukrową. Na stronie 69 rozprawy dowiadujemy się, że nie są znane naturalne glikozydy diosgenyłu, mające w części cukrowej grupę  $\text{NH}_2$ . Ciekawi mnie, czy są znane inne saponiny, które zawierałyby jednostki glukozaminy i jeśli tak, to jaka aktywność biologiczna im towarzyszy? N-acetylo glukozamina została przedstawiona na rysunku 11 jako jednostka cukrowa wchodząca w skład saponin, ale nie znalazłam w tekście żadnego konkretnego przykładu.

Drobna uwaga dotyczy zaprezentowania aktywności antyproliferacyjnej frakcji saponin, którą Autorka przedstawiła na rysunku 16. Brakuje odniesienia w tekście do tego rysunku i wyjaśnienia, co on dokładnie przedstawia. Uważam, że można było opisać, co oznaczają poszczególne kolory na obrazach mikroskopowych, albo w ogóle rysunku nie zamieszczać.

Ostatni rozdział części literaturowej poświęcony jest metodom syntezy saponin steroidowych i modyfikacji funkcji aminowej 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydu diosgenyłu. Przedstawione są przykłady syntezy pochodnych cynamoilu, mocznikowych i tiosemikarbazonów, które opisał Wang i współpracownicy w 2012 roku (poz. lit. 171). Największą aktywność cytotoksyczną wobec badanych sześciu linii komórkowych miały pochodne cynamoilu (tabela 11) i to zapewne skłoniło Autorkę do prac nad modyfikacjami N-

acylowymi w swoich badaniach. Autorka przytacza też inne *N*-acylowe pochodne syntezowane i badane wobec linii komórek nowotworowych przez Kaskiwa i współpracowników w 2008 roku (poz. lit. 172). Podobnie jak poprzednio związki charakteryzowały się obiecującą aktywnością przeciwnowotworową (tabela 12), a zdaniem Autorów miały na to wpływ podstawniki w pozycji 2-NH<sub>2</sub> reszty cukrowej. Brakuje informacji na temat badań z udziałem komórek prawidłowych, czy autorzy takich badań nie przeprowadzili?

W kolejnej części rozprawy Autorka omawia wyniki badań własnych. W pierwszej kolejności opisana jest synteza dwóch kluczowych substratów do badań: 2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu diosgenyłu (**5**) i jego peracetylowanej pochodnej **10**. Synteza substratów wymaga wieloetapowej syntezy. Zasadnicza reakcja sprzęgania bromków glikozylowych z diosgeniną w obecności AgOTf zachodzi z wydajnością ponad 80% i prowadzi do peracetylowanych produktów **4** i **9**, które różnią się zabezpieczeniem grupy aminowej: odpowiednio jest to grupa tetrachloroftalimidowa (TCP) i trichloroetoksykarbonylowa (Troc). Na schemacie 23 zaprezentowana jest synteza związków **4** i **9**. Glikozydowanie było wydajne i stereoselektywne i prowadziło do otrzymania wyłącznie β-glikozydów. Autorka tłumaczy, że reakcja zachodzi poprzez utworzenie kationu acetykarboksoniowego i powoduje, że jedynym możliwym produktem jest β-glikozyd. Podobnie zachodzą reakcje z użyciem łatwo dostępnej peracetylowanej glukozaminy (m. in. Takasu et al., *Macromol. Rapid Commun.* 21, 764–769, 2000). Wówczas powstaje oksazolinowy produkt przejściowy, który można wykorzystać w reakcjach β-glikozydowania. Takie podejście uprościłoby ścieżkę syntetyczną, ale być może nie byłoby możliwe usunięcie grupy *N*-acetylowej z glikozydu diosgenyłu. Zastanawiam się czy Autorka brała po uwagę taka strategię.

Nieco wprowadzający w błąd jest schemat 25, z którego mogłoby wynikać, że oba związki **4** i **9** ulegają przemianom zarówno do związku **5** i **10**, z opisu jednak wynika, że tak nie jest.

W toku dalszych badań glukopiranozyd diosgenyłu **5** został wykorzystany do syntezy *N*-acylowych pochodnych, które zawierają reszty aminokwasowe i hydroksykwasowe.

Na stronie 84 Autorka napisała: „Pojedyncze aminokwasy mogą być również używane jako nośniki leków, ponieważ mają zdolność transportu przez tkanki. Co jest niezwykle istotne, sprzężenie aminokwasów ze związkami biologicznie czynnymi może powodować ich zwiększoną aktywność farmaceutyczną”. Chciałam zapytać, co dokładnie Autorka miała na myśli, uznając aminokwasy jako nośniki leków?

Synteza finalnych związków do badań opisana jest bardzo dokładnie, zastosowane zostały różne warianty kondensacji grupy aminowej glukozydu diosgenyłu z pochodnymi aminokwasowymi i hydroksykwasami, a struktury wszystkich związków są odpowiednio potwierdzone metodami spektroskopowymi.

Ostatnią częścią omówienia wyników są badania biologiczne. W tabeli 15 Autorka przedstawiła wyniki badań przeprowadzonych na wybranych szczepach bakterii i grzybów dla piętnastu finalnych związków. Mam kilka uwag do tej części pracy:

- Moje wątpliwości dotyczą związku **5a**, czyli chlorowodorku glukozaminozydu diosgenyłu. Dlaczego w badaniach biologicznych nie zastosowano formy zasadowej,

czyli związku **5**? Uważam, że związek **5** byłby lepszym porównaniem dla całej serii badanych związków, gdyż jest mniej polarny i nie jest zjonizowany podobnie jak pozostałe testowane związki.

- Uważam, że cenne byłoby w badaniach biologicznych zastosować jakieś znane związki przeciwgrzybicze i/lub przeciwbakteryjne jako punkt odniesienia; albo zastosować inne naturalne saponiny.
- Z uwagi na zjawisko odporności wielu szczepów mikroorganizmów na stosowane antybiotyki, a także mechanizmy obronne komórek grzybów i bakterii, duże oczekiwania pokłada się w terapiach skojarzonych, które pozwoliłyby na ograniczenie dawek stosowanych antybiotyków. Moim zdaniem badania biologiczne przeprowadzone w ramach pracy zyskałyby, gdyby Autorka przeprowadziła badania synergizmu najbardziej aktywnych związków ze znanymi antybiotykami o właściwościach odpowiednio bakterio- i grzybobójczych.

W części doświadczalnej Autorka opisuje dokładnie wszystkie przeprowadzone syntezy, bardzo starannie dokumentuje charakterystykę produktów pośrednich i końcowych.

Wszystkie nowe związki poddane zostały charakterystyce metodami spektroskopowymi:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC NMR oraz analizie MS (HRMS i MALDI TOF-MS). Wyniki analiz zostały bardzo starannie opisane w tabelach 18-35, do pełnej charakterystyki związków brakuje jedynie parametru skręcalności właściwej.

Znalazłam w pracy kilka błędów edytorskich (literówki, błędy na schematach), ale ogólnie praca napisana jest bardzo starannie, czytelnie i stylistycznie poprawnie. Kilka dodatkowych uwag, które nie wymagają odpowiedzi przedstawiam poniżej:

- Niekonsekwencje dotyczące stosowania skrótów:
  - niektóre skróty zostały pominięte w spisie skrótów, np. Troc, PDC
  - niektóre skróty w spisie skrótów widnieją jako skróty literowe np. DCM, a na schematach jako  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (np. strona 77)
  - w wykazie skrótów jest DIPEA, a na niektórych schematach (np. 19) i tekście jest stosowany skrót DIEA
  - w wykazie skrótów jest TCPO, a na schemacie 21 stosowany jest skrót TCPA
- Błędy na schematach:
  - Schemat 19: brakuje tlenu w grupie karbonylowej w związkach **79** i **80**
  - Schemat 21: w ścieżce a2 brakuje atomu węgla we wzorze  $\text{CCl}_3\text{CH}_2\text{OCOCl}$ , ponadto chlorek ten powinien być oznaczony TrocCl, podobnie jak grupa Troc w innych miejscach
  - Schemat 27: opis związku **20** wskazuje, że są tam dwie identyczne grupy R i R'
  - Schemat 29: substrat i produkt to identyczne struktury, lepiej zastosować oznaczenia R1, R2, R3, itd
  - Schemat 35: powinien być związek **10** zamiast związku **5**

Powyższe uwagi polemiczne i krytyczne nie wpływają na końcową ocenę rozprawy. Cel pracy

- synteza nowych *N*-acylowych pochodnych 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydu

diosgenylu oraz ocena ich właściwości biologicznych została zrealizowana pomyślnie. A co najważniejsze, związki posiadały aktywność biologiczną w stosunku do badanych szczepów na poziomie kilku - kilkudziesięciu mg/mL, wyrażoną jako minimalne stężenie hamujące (MIC). Autorka wykazała się niewątpliwie dobrym przygotowaniem merytorycznym, dużą starannością w planowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów.

W podsumowaniu chciałabym stwierdzić, że wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej posiadają elementy nowości naukowej i zostały już opublikowane w czterech publikacjach naukowych z listy JCR i jednej z poza tej listy, a manuskrypt szóstej publikacji dotyczącej tematu rozprawy jest w końcowej fazie przygotowania.

Uważam, że rozprawa doktorska pt ***Synteza i właściwości N-acylowych pochodnych 2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozydu diosgenylu*** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i z pełnym przekonaniem wnioskuję o dopuszczenie mgr Darii Grzywacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż. Ilona Wandzik, prof. nzw. Pol. Śl.