

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Walczewskiej

## Synteza i właściwości biologiczne *N*-podstawionych pochodnych $O^3$ -(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny

Wśród glikozydów, czyli połączeń cukrów z fragmentami niecukrowymi lub innymi sacharydami zawierającymi wiązanie glikozydowe, jest wiele związków o interesującym działaniu biologicznym, w tym także leków. Potencjalna przydatność glikozydów w medycynie stanowi główną siłę napędową dla badań nad syntezą nowych glikozydów oraz poszukiwaniem i izolacją takich związków ze źródeł naturalnych, gdzie dość bogato występują. Spośród licznych grup badawczych zajmujących się syntezą glikozydów ważne miejsce zajmuje zespół z pracowni Glikochemii Wydziału Chemii UG. Zespół ten kontynuuje bogate tradycje badań w zakresie chemii cukrów na Uniwersytecie Gdańskim zapoczątkowanych przez prof. prof. Janusza Sokołowskiego i Zygfryda Smiatacza oraz pomyślnie kontynuowanych przez nieodżałowanego prof. Andrzeja Wiśniewskiego. To właśnie pod kierunkiem prof. Wiśniewskiego i pod opieką Jego współpracowników, dr hab. Beaty Liberek i dr. Henryka Myszki, rozpoczęła i przez lata prowadziła badania p. Agata Walczewska. Rezultatem końcowym tych badań jest przedstawiona do oceny recenzentów rozprawa doktorska.

Przedmiotem projektu badawczego, którego wyniki stanowią podstawę rozprawy doktorskiej p. Walczewskiej była synteza i charakterystyka szeregu nowych glikozydów diosgeniny. Zainteresowanie tymi związkami jest uzasadnione różnorodnymi, ciekawymi właściwościami biologicznymi wielu znanych dotychczas związków tego typu, zarówno pochodzenia naturalnego jak i otrzymanych na drodze syntezy. Faktem jest natomiast, że w znakomitej większości przypadków, nie są znane molekularne podstawy tych zróżnicowanych aktywności. Z tego powodu, nie wydaje się na razie możliwe tzw. racjonalne projektowanie struktur nowych pochodnych w celu otrzymania związków o określonym typie aktywności. Pozostaje w tej sytuacji droga syntezy szeregu pochodnych, możliwie jak największej ich ilości w celu utworzenia biblioteki związków, wszechstronne przebadanie ich właściwości biologicznych i na tej podstawie wyselekcjonowanie struktur wiodących, do ich dalszej optymalizacji. Szczególne możliwości w tym względzie wydają się stwarzać takie glikozydy diosgeniny, w których fragment cukrowy zawiera ugrupowanie lub ugrupowania chemiczne mogące podlegać selektywnej funkcjonalizacji, co otwiera drogę do otrzymania szeregu pochodnych. Taką rolę może np. pełnić grupa aminowa i wychodząc z tego założenia Doktorantka zainteresowała się glukozaminozydami diosgenylnymi, czyli związkami, w których fragment cukrowy pochodzi od 2-amino-2-deoksy-D-glukozy, zwanej zwyczajowo D-glukozaminą. Warto w tym miejscu wspomnieć, że najprostszy możliwy związek z tej grupy, czyli  $O^3$ -(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny, jak również kilka jego *N*-acylowych pochodnych zostało już wcześniej opisanych w pracach Kaskiw i wsp. oraz publikacjach grupy gdańskiej współautorstwa dr. H. Myszki.



Wynikiem pracy Doktorantki było otrzymanie 13 glukozaaminozydów diosgenylu, z których 10 jest związkami nowymi, nie opisanymi dotychczas w literaturze. Do grona nowych związków należy 9 pochodnych *N*-alkilowych oraz jedna pochodna *N*-alkiloureidowa. Doktorantka opracowała optymalne metody syntezy tych związków, dokonała charakterystyki ich właściwości fizykochemicznych, w tym spektralnych, potwierdzając jednocześnie w sposób jednoznaczny ich strukturę oraz poddała wszystkie otrzymane związki końcowe badaniom aktywności przeciwdrobnoustrojowej, w tym przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej. Warto podkreślić, że ukierunkowanie na poszukiwanie związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej stanowi stosunkowo nowe podejście w badaniach glikozydów diosgeniny, jako że w większości dotychczasowych prac nad związkami tego typu skupiano się raczej na aktywności cytostatycznej.

W przyjętej przez Doktorantkę strategii syntezy można wyróżnić trzy wyraźne fazy: 1. otrzymanie substratu do glikozylacji diosgeniny w postaci odpowiednio chronionej pochodnej *D*-glukozaaminy; 2. utworzenie wiązania glikozydowego i zdjęcie osłon; 3. funkcjonalizacja grupy aminowej. Taka kolejność oraz dobór odpowiedniej grupy ochronnej dla funkcji aminowej w postaci reszty tetrachloroftaloilowej zapewniały stereoselektywność podczas glikozylacji, w wyniku której powstawał jedynie jeden z dwóch możliwych anomerów, anomer  $\beta$ . W tym miejscu pozwolę sobie na małą dygresję – myślę, że warto sprawdzić, czy stereochemia wiązania glikozydowego ma znaczenie dla aktywności przeciwdrobnoustrojowej glukozaaminozydów diosgenylu. Dobierając metody realizacji poszczególnych etapów, Doktorantka dla fazy 1 i 2 zastosowała metodykę opracowaną przez Myszkę i wsp. przy syntezie  $O^3$ -(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -*D*-glukopiranozylo)diosgeniny, natomiast dla fazy 3 – reakcję redukcyjnego alkilowania wg warunków opracowanych przez Liberek i wsp. Wszystkie otrzymane związki końcowe oraz niektóre związki pośrednie zostały w pełni scharakteryzowane za pomocą spektroskopii  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR, IR oraz MS. Oznaczenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej wykonane zostały przez wyspecjalizowane laboratoria w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym i w Università Politecnica delle Marche w Ankonie, Włochy. Doktorantka dokonała analizy uzyskanych wyników podejmując próbę ustalenia zależności pomiędzy strukturą a aktywnością. Otrzymane związki nie wykazywały aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych, natomiast były aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich i trzech szczepów grzybowych. Aktywność niektórych z otrzymanych związków można uznać za interesującą. W przypadku aktywności przeciwbakteryjnej wobec bakterii Gram-dodatnich dotyczy to szczególnie pochodnej *N*-etylowej **13** i *N*-propylowej **15**, dla których wyznaczono wartości MIC na poziomie 0,5 – 8  $\mu g/ml$  i były to wartości znacznie lepsze niż dla znanego wcześniej związku **11** czyli  $O^3$ -(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -*D*-glukopiranozylo)diosgeniny. W przypadku aktywności przeciwgrzybowej, niskie wartości MIC w zakresie 1 – 8  $\mu g/ml$  stwierdzono wobec grzybów z rodzaju *Candida* dla kilku *N*-alkilowych pochodnych, przy czym aktywność przeciwgrzybowa generalnie malała wraz ze wzrostem długości łańcucha *N*-alkilowego. Tak więc, w wyniki postawionego przed Nią zadania badawczego, Doktorantka opracowała warunki syntezy i otrzymała szereg nowych związków o strukturze glukozaaminozydów diosgenylu, z których niektóre wykazują wysoką aktywność przeciwbakteryjną wobec bakterii Gram-dodatnich i przeciwgrzybową wobec grzybów z rodzaju *Candida*.

Podstawową kwestią przy ocenie rozprawy doktorskiej, jako pracy, dzięki której możliwe będzie nadanie stopnia naukowego doktora jest wykazanie spełnienia ustawowego wymogu obecności elementów nowości naukowej. W przypadku



rozprawy p. Walczewskiej elementem tym jest otrzymanie 10 nowych związków chemicznych o interesujących właściwościach biologicznych. Wartości pracy nie obniża w mojej opinii fakt, że w strategii syntezy nie stosowano żadnych nowych metod syntetycznych. Wydaje mi się, że nie było takiej potrzeby, a optymalny dobór metodyki postępowania i optymalizacja warunków dokonane przez Doktorantkę także stanowią cenną wartość dodaną. W tej sytuacji nie mam wątpliwości, że rozprawa Doktorantki zawiera elementy nowości naukowej. Jestem ponadto przekonany, że Doktorantka jest dobrym chemikiem-organikiem, wykazała się biegłością warsztatową w zakresie syntezy organicznej i umiejętnościami w zakresie interpretacji wyników analizy spektralnej związków organicznych, w szczególności zaś wykorzystania spektroskopii NMR do analizy cukrów i ich pochodnych.

Dysertacja p. Walczewskiej spisana została na 95 stronach, ilustrowana jest licznymi schematami i wykresami, zawiera cytaty ze 169 pozycji literaturowych. Układ pracy można uznać za standardowy. Główne jej rozdziały to kolejno: część literaturowa, cel pracy, część doświadczalna, czyli opis materiałów i metod eksperymentalnych, dyskusja uzyskanych wyników, podsumowanie i spis piśmiennictwa. Osobiście przyzwyczajony jestem do obecności w rozprawie doktorskiej streszczenia, umieszczanego zwykle na jej początku. W rozprawie p. Walczewskiej brak tego elementu (umieszczone na końcu **Podsumowanie** spełnia tylko w pewnym stopniu rolę streszczenia), być może jednak jest to zgodne ze standardami obowiązującymi na macierzystym wydziale Doktorantki.

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy, zatytułowane jako **Część literaturowa** zajmuje formalnie 32 strony, jednakże analogiczny charakter ma wprowadzenie do p. 4.11 w rozdziale **IV. Dyskusja wyników** (około 1,5 strony). stron. Około 2/3 objętości **Części literaturowej** stanowi szczegółowa charakterystyka znanych metod tworzenia wiązania glikozydowego, a 1/3 – omówienie antybiotyków aminoglikozydowych. Ta część rozprawy została opracowana bardzo dobrze, zawiera szereg cennych, interesujących danych, wspartych cytatami do jak najbardziej aktualnej literatury. Szczególnie wysoko oceniam opis metod syntezy glikozydów. Jest to wyczerpujące kompendium wiedzy na ten temat. Fragment dotyczący antybiotyków aminoglikozydowych jest interesujący, natomiast jego umieszczenie w rozprawie (uzasadnione zapewne faktem, że związki otrzymane przez Doktorantkę można również nazwać aminoglikozydami), jest nieco dyskusyjne, gdyż w mojej opinii istnieje bardzo niewielkie prawdopodobieństwo, że mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania związków otrzymanych przez Doktorantkę ma cokolwiek wspólnego z mechanizmem przeciwbakteryjnej aktywności klasycznych antybiotyków aminoglikozydowych, tak więc można mówić jedynie o bardzo formalnej analogii tych grup związków.

Drobne uwagi merytoryczne do **Części literaturowej**:

W kilku pierwszych zdaniach na str. 9, gdzie jest mowa o różnych rodzajach aktywności biologicznej glikozydów zabrakło mi słówka „niektóre”, bez którego można nabrać mylnego przekonania, że wszystkie glikozydy wykazują wszystkie wymienione typy aktywności biologicznej.

Str. 32, wiersze 5-7 od góry. Niektóre antybiotyki makrolidowe posiadają aglikon większy, niż wymienione 14-16; szczególnie dotyczy to przeciwgrzybowych makrolidów polienowych, gdzie występują pierścienie około 30-członowe.

Str. 33, wiersz 11-14 od góry. Niezbyt zrozumiałe powiązanie pomiędzy udziałem jonów wapnia i magnezu w transporcie antybiotyków aminoglikozydowych przez błonę komórkową, a sugerowaną w następnym zdaniu koniecznością obecności przENOśników elektronów.



Rozdział **Cel pracy** zawiera także elementy opracowania literaturowego. O sformułowaniu faktycznego celu można mówić dopiero w odniesieniu do końcowego akapitu na str. 43. W końcowej części tego akapitu wymienionych zostało 5 jasno zdefiniowanych celów cząstkowych, natomiast chyba trochę zabrakło wyróżnienia wśród nich celu głównego, którym w mojej opinii była chyba jednak synteza i określenie właściwości biologicznych *N*-alkilowych pochodnych aminoglikozydów diosgeniny.

Opis stosowanych metod eksperymentalnych, w tym głównie metod syntezy, zatytułowany **Część doświadczalna**, został opracowany w sposób w pełni profesjonalny, wg najlepszych wzorów, bardzo precyzyjnie i dokładnie. Jedyna drobna uwaga to tej części pracy, to kilkukrotne błędne zastosowanie oznaczenia stężenia molowego (mM) w miejscach, gdzie wskazane byłoby użycie określenia ilości (mmol), np. na str. 48, wiersz 7 od góry.

Rozdział zatytułowany **Dyskusja wyników** zawiera opis tych wyników i ich dyskusję i zajmuje 30 stron z czego około 2/3 to opis syntez i analizy strukturalnej produktów tych syntez. W opiach opisach reakcji fazy 1 i 2 Doktorantka jest stosunkowo lakoniczna, co jest w oczywisty sposób uzasadnione faktem, że reakcje te są już znane i opisane w literaturze. Prawie wszystkie reakcje wykonywane były w jednej, optymalnej zdaniem Autorki wersji, z wyjątkiem przekształcania 1,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-2-deoksy-2-(3,4,5,6-tetrachloroftalimido)- $\alpha,\beta$ -D-glukopiranozy w halogenopochodną, gdzie otrzymano bromo- i chloropochodne. Doktorantka chciała sprawdzić efektywność obu wersji donorów glukozaminy w reakcji sprzęgania z diosgeniną. W efekcie znacznie wyższą wydajność osiągnięto w reakcji z bromopochodną jako substratem, co wydaje się być zgodne z przewidywaniami. Chciałbym jednak wyrazić uznanie dla bardzo kompetentnej i wyczerpującej analizy strukturalnej, szczególnie w odniesieniu do spektroskopii NMR.

Opis reakcji funkcjonalizacji grupy aminowej, czyli fazy 3 syntezy wydaje się najbardziej interesującym wątkiem opisu metod syntezy, głównie z uwagi na różnice w rodzajach otrzymanych produktów, w zależności od struktur stosowanych substratów alkilujących. Doktorantka stosowała metodę redukcyjnego alkilowania, gdzie substratami były aldehydy o długościach łańcucha 1-6 dodawane do mieszaniny reakcyjnej w nadmiarze molowym 1,2 w stosunku do glukozaminy diosgeniny. W drugiej fazie tej reakcji, powstałe iminy były redukowane za pomocą  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Wydajności tych reakcji nie były szczególnie wysokie (13-60%) i w większości przypadków otrzymywano mieszaninę pochodnych mono- i dialkilowych, które rozdzielano za pomocą chromatografii kolumnowej. Metoda, którą w tym przypadku zastosowano, była zmodyfikowaną wersją metody opracowanej uprzednio w pracowni Glikochemii WCH UG dla potrzeb otrzymywania *N*-alkilowych pochodnych D-glukozaminy. W tamtym przypadku, gdzie stosowano dwukrotny nadmiar substratu aldehydowego w stosunku do *O*-acetylowanego aminocukru, także otrzymywano mieszaniny mono- i dipodstawionych pochodnych, obserwując jednocześnie wyraźny spadek udziału produktów dipodstawionych wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego aldehydu. W przypadku badań p. Walczewskiej, stosowany nadmiar aldehydu był dużo mniejszy, a zależność proporcji produktów mono do dipodstawionych od długości łańcucha aldehydu – nie tak oczywista. Szkoda, że Autorka nie pokusiła się o dyskusję, interpretację, porównanie tych wyników, być może także z pracami innych autorów

Podrozdział 4.11 zawierający opis i dyskusję wyników badań nad aktywnością przeciwdrobnoustrojową związków otrzymanych przez Doktorantkę rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem zawierającym uzasadnienie potrzeby poszukiwania nowych



chemoterapeutyków przeciwdrobnoustrojowych. Pierwsza część tego opisu odnosząca się do chemoterapii przeciwgrzybowej zawiera zestawienie rodzajów stosowanych obecnie leków przeciwgrzybowych. Zestawienie to jest jednak częściowo błędne i niekompletne. Brak w nim bardzo ważnej grupy stosowanych w klinikach antymykotyków, jakimi są inhibitory demetylazy lanosterolowej z grupy pochodnych azoli i triazoli, takich jak Flukonazol, Ketokonazol, czy Worikonazol, natomiast niektóre z wymienionych związków, w tym polioksyna, allozamidyna czy azoksybacyllina, chociaż wykazują działanie przeciwgrzybowe, to nie są stosowane w leczeniu, a więc nie można ich nazywać lekami.

Za niefortunne uważam umieszczenie w rozprawie wyników opisanych w podrozdziale 4.11.2, dotyczących działania chlorowodoru  $O^3$ -(2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozylo)diosgeniny (związek **11**) na kliniczne szczepy bakterii gram-dodatnich. Są to wyniki, które opisane zostały uprzednio w publikacji autorstwa Cirioni i wsp. w *Journal of Medical Microbiology* z roku 2011. W gronie współautorów tamtej publikacji nie ma p. Walczewskiej, co wydaje się sugerować, że nie brała Ona udziału w badaniach, których wynikiem była publikacja w *J. Med. Microbiol.* W tej sytuacji, decydując się na umieszczenie tych wyników w obecnej własnej rozprawie Doktorantka powinna była podać odpowiedni cytat. Swoją drogą szkoda, że nie zostały zapewne przeprowadzone analogiczne do opisanych w publikacji z *J. Med. Microbiol.* badania dotyczące związków **13** i **15** otrzymanych przez Doktorantkę, gdyż ich aktywność wobec wzorcowych szczepów bakterii gram-dodatnich jest większa, niż aktywność związku **11** (Tab. 4.41 z rozprawy), tak więc i aktywność wobec szczepów klinicznych może być korzystniejsza.

Sporządzając spis cytowanej literatury Doktorantka zadbała o jednolity styl układu cytatów. Cytowane pozycje literaturowe zostały dobrane w znakomitej większości przypadków umiejętnie i właściwie. Jedyne zastrzeżenie mam do poz. 168 z roku 1999, gdyż istnieje wiele prac przeglądowych znacznie bardziej aktualnych omawiających problemy chemoterapii przeciwgrzybowej

Rozprawa doktorska p. Walczewskiej jest napisana bardzo dobrym językiem, czyta się ją z przyjemnością. Na podkreślenie zasługuje wysoka jakość edycji rozprawy oraz korekty tekstu – zauważyłem jedynie minimalną ilość błędów edytorskich.

Mgr Walczewska jest współautorką jednej wieloautorskiej publikacji w *Carbohydrate Research* z roku 2013, zawierającej chyba dość niewielką część wyników badań opisanych w rozprawie doktorskiej. Mam nadzieję, że najważniejsze wyniki, w tym synteza i opis aktywności biologicznej *N*-alkilowych pochodnych glukozaminy diosgeniny zostaną wkrótce przedstawione w postaci publikacji w czasopiśmie naukowym o szerokim zasięgu, bo niewątpliwie są tego warte.

Analiza treści przedstawionych powyżej uwag i zastrzeżeń wyraźnie wskazuje, że większość z nich wynika prawie na pewno z niedokładności lub niezręczności opisu, a nie rzeczywistych błędów. **Nie mam wątpliwości, że przedstawiona rozprawa zawiera elementy nowości naukowej, a moja pozytywna ocena jej zawartości skłania mnie do sformułowania wniosku o dopuszczenie p. mgr Agaty Walczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

  
Sławomir Milewski