



# INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

dr hab. Zbigniew Pakulski, prof. nadzw.  
Instytut Chemii Organicznej PAN  
ul. Kasprzaka 44/52  
01-224 Warszawa

Warszawa, 8. sierpnia 2016

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr Anety Marii Tomkiel** ***Elektrochemiczna synteza pochodnych cukrowych $\Delta^5$ -steroidów***

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Anety Marii Tomkiel została wykonana w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr. hab. Jacka W. Morzyckiego. Praca ta stanowi twórcze rozszerzenie wcześniejszych badań i wpisuje się logicznie w tematykę realizowaną w laboratorium Promotora.

Steroidy stanowią obszerną grupę produktów naturalnych. Chyba najbardziej znanym i wywołującym najwięcej emocji steroidem jest cholesterol, który dzięki umiejętnemu podsycaniu negatywnych skojarzeń i manipulowaniu faktami awansował do grona głównych zabójców ludzkości, przynosząc przy okazji krociowe zyski firmom farmaceutycznym. Tymczasem jest to substancja niezbędna do życia, obecna praktycznie we wszystkich komórkach organizmu i biorąca udział w niezliczonej liczbie procesów biochemicznych. Dogłębne poznanie chemii cholesterolu jest niezbędne nie tylko dla zrozumienia dróg jego przemian w organizmie, ale ma również istotne znaczenie w syntezie pochodnych wykorzystywanych w terapii. Duże zainteresowanie wzbudzają również pochodne cukrowe cholesterolu ze względu na interesującą aktywność biologiczną.

Celem badań doświadczalnych Autorki recenzowanej rozprawy było opracowanie efektywnej metody syntezy pochodnych cukrowych steroidów (głównie cholesterolu) na drodze elektrochemicznej. Przed rozpoczęciem badań przez Doktorantkę, był to stosunkowo słabo poznany obszar chemii. Należy pamiętać, że chemiczne metody syntezy pochodnych cukrowych steroidów często są mało wydajne lub wymagają stosowania aktywacji np. metalami ciężkimi. Dlatego próby zastosowania alternatywnych metod elektrochemicznych mogą być bardzo interesującą i obiecującą metodą syntezy szeregu pochodnych cukrowych steroidów.

Praca liczy 125 stron i ma klasyczny układ treści. W krótkim wstępie Autorka w zwięzły i klarowny sposób przedstawiła cele swojej pracy. Kolejny rozdział liczący 29 stron to przegląd najważniejszych pozycji literaturowych dotyczących tematyki rozprawy. Doktorantka omówiła w nim strukturę i znaczenie biologiczne cholesterolu. Następnie szczegółowo przedstawiła

chemiczne i enzymatyczne metody utleniania cholesterolu. Rozdział kończy się zwięzłym omówieniem metod elektrochemicznego utleniania cholesterolu. Przegląd literatury należy uznać za bardzo zwięzły, a jednocześnie klarowny i w wystarczający sposób prezentujący informacje niezbędne do zrozumienia prowadzonych badań i stojących przed Doktorantką wyzwań badawczych. Moim zdaniem, można by go nawet skrócić, rezygnując z podrozdziału dotyczącego utleniania łańcucha bocznego. Badane przez Autorkę elektrochemiczne przemiany cholesterolu dotyczą praktycznie wyłącznie pozycji 3 i 6, tak więc omawianie reakcji w odległym łańcuchu bocznym leży nieco poza głównym tematem pracy. Podejrzewam, że wobec skromnego materiału literaturowego dotyczącego przemian elektrochemicznych cholesterolu, Autorka starała się zwiększyć objętość tego fragmentu rozprawy obawiając się, że będzie uznany za zbyt krótki.

Kolejny rozdział liczący 35 stron to omówienie badań własnych. Doktorantka rozpoczęła badania od syntezy szeregu pochodnych tioeterowych cholesterolu i *i*-cholesterolu oraz ich elektrochemicznego utleniania w obecności cukrów. Modelowym substratem cukrowym była 1,2:3,4-di-*O*-izopropylideno- $\alpha$ -D-galaktopiranoza posiadająca wolną, pierwszorzędową grupę hydroksylową w pozycji 6. W najlepszym przypadku, oczekiwany produkt przyłączenia reszty cukrowej powstawał z wydajnością 52%. Poważnym problemem była izomeryzacja sulfidów *i*-cholesterylu do mało reaktywnych sulfidów cholesterylu i ich krótki czas życia w warunkach reakcji. Logicznym posunięciem wydawało by się więc zastosowanie nadmiaru (taniego) reagenta cukrowego w celu zwiększenia wydajności pożądanego produktu. Tymczasem mgr Tomkiel stosowała nadmiar sulfidu otrzymując produkt, jak można się było spodziewać, ze znacznie niższą wydajnością (Tabele 2 i 3). Reakcje z innymi substratami cukrowymi były nieco mniej wydajne, a synteza glikozydów przebiegała nieselektywnie prowadząc do mieszaniny anomerów.

Analogiczne selenki okazały się słabymi donorami dając produkt z wydajnością 33%. Dobrym pomysłem okazało się natomiast zastosowanie łatwo dostępnych eterów *i*-cholesterolu. Ich anodowe utlenianie w obecności modelowego cukru prowadziło do pożądanego produktu z wydajnością na ogół przekraczającą 50%. Etery cholesterolu były dla odmiany bardzo słabymi donorami. Podobnie, niepowodzeniem zakończyło się użycie merkaptanu, rodanku oraz estrów i halogenków cholesterylu. Bardzo skutecznymi reagentami okazały się natomiast trichloroacetoimidan, dimetylofosforan(III) (dawniej: fosforyn) i difenylofosforan(V) cholesterylu.

Ten ostatni związek został wybrany przez Autorkę rozprawy jako najbardziej obiecujący substrat i wykorzystany do sprzęgania z innymi reagentami cukrowymi jako modelowy donor. Wybór należy uznać za w pełni uzasadniony. Difenylofosforan(V) cholesterylu był nie tylko związkiem wysoce aktywnym w badaniach modelowych, ale również jego synteza była prosta (bezpośrednia estryfikacja cholesterolu) i bardzo wydajna (91%).



Na zakończenie badań mgr Tomkiel przeprowadziła elektrochemiczne utlenianie difenylofosforanu(V) cholesterylu w obecności cukrów z 3 lub 4 wolnymi grupami hydroksylowymi. Z wyjątkiem 1,2-*O*-izopropylideno- $\alpha$ -D-glukofuranozy, która dawała wyłącznie jeden produkt podstawiony w pozycji 6, w pozostałych przypadkach reakcje były nieselektywne i tworzyły się złożone mieszaniny produktów. Zaskakujący wynik przyniosła reakcja z glikozydem metylu. Głównym produktem była podstawiona w pozycji 3 glukozy monopochodna, natomiast nie zaobserwowano analogu podstawionego w pozycji 6 (bardziej reaktywna pierwszorzędowa grupa hydroksylowa). Interesujący wynik dała reakcja z tetraoctanem 1-tioglukozy, w której produktem głównym był niespodziewanie związek podstawiony w pozycji 6 *i*-cholesterolu. Badania własne zamyka jednostronicowe Podsumowanie. W bardzo zwartej i jednocześnie klarownej formie Autorka przedstawiła wszystkie najważniejsze osiągnięcia i wyniki swojej pracy.

Jednym z ważniejszych zadań recenzenta jest znalezienie słabych punktów recenzowanej rozprawy. W tym przypadku było to trudne zadanie. Spełniając obowiązek recenzenta, jestem zmuszony do skupienia się na mniej istotnych elementach rozprawy, nie mających większego znaczenia z punktu widzenia oceny pracy.

Największym problemem wydaje się być zaledwie dobra wydajność oczekiwanych produktów sprzęgania. Doktorantka, podejmując próby zwiększenia wydajności reakcji, konsekwentnie używa nadmiaru reagentów steroidowych. Przyznam, że nie rozumiem takiego podejścia. Logiczne wydaje się stosowanie nadmiaru, ale substratów cukrowych, tym bardziej że są one tanie i łatwo dostępne. Powinno to zwiększyć prawdopodobieństwo przereagowania kationu homoallilowego przed jego izomeryzacją i w efekcie podwyższyć wydajność. O takim wariacie Autorka wspomina zresztą na stronie 37. Jeden eksperyment z nadmiarem reagenta cukrowego został opisany w Tabeli 8 (prawdę mówiąc nie zakończył się sukcesem), ale moim zdaniem to i za mało, i za późno, aby wyciągać dalej idące wnioski.

Część donorów, zwłaszcza pochodnych cholesterolu, okazała się nieaktywna w warunkach aktywacji elektrochemicznej. Prawdopodobnie nie ulegały one aktywacji w badanym zakresie potencjałów. Można było uniknąć straty czasu na przeprowadzanie skazanych na niepowodzenie reakcji i żmudnego rozdzielania powstających ze znikomą wydajnością produktów mierząc voltamperogramy wszystkich donorów przed rozpoczęciem badań z udziałem pochodnych cukrowych i eliminując nieaktywne substraty. Jak się wydaje, takie pomiary nie zostały wykonane, a reakcje z cukrami prowadzono dla wszystkich otrzymanych pochodnych cholesterolu.

Brakuje mi również próby wyjaśnienia różnic w reaktywności poszczególnych pochodnych cholesterolu i propozycji bardziej szczegółowego mechanizmu sprzęgania. Niewątpliwie, we wszystkich przypadkach za reaktywność odpowiada tworzący się kation homoallilowy. Różnice

w jego aktywności muszą więc wynikać z istnienia dodatkowych efektów, które ułatwiają (lub utrudniają) reakcję z substratem cukrowym. Zabawa w spekulacje, czy są to efekty steryczne (zawady generowane przez grupę odchodzącą), stabilizacja przez tworzenie par jonowych lub inne czynniki była by interesującym uzupełnieniem dyskusji.

Rozprawę doktorską zamyka obszerna część eksperymentalna zawierająca szczegółowy opis przeprowadzonych syntez i analizy strukturalnej. Przy każdym opisie Autorka zamieściła wzór strukturalny związku, co znakomicie ułatwia odszukanie konkretnego preparatu i analizę danych. Niestety, Autorka pominęła niektóre, bardzo istotne, dane fizykochemiczne. Brakuje pomiarów skręcalności właściwej. Nie zostały również zamieszczone wyniki analiz elementarnych lub masowych wysokiej rozdzielczości. Traktuję to jako przeoczenie, ponieważ brakujące dane można znaleźć w publikacjach Doktorantki.

Podsumowując, pod względem edytorskim i językowym praca przygotowana jest bez zarzutu i sprawia bardzo dobre wrażenie estetyczne. Schematy są klarowne i czytelnie ilustrują przedstawiane wyniki. Korekta wykonana została bardzo starannie. Błędy literowe, gramatyczne czy niezręczne sformułowania są bardzo nieliczne, nie mają żadnego wpływu na wartość merytoryczną pracy i nie warto ich wymieniać.

Pod względem merytorycznym nie mam do przedstawionej pracy żadnych zastrzeżeń. Kilka wspomnianych powyżej uwag ma charakter głównie porządkowy i służy wyjaśnieniu wątpliwości recenzenta. Plan badań został starannie przemyślany i wykonany. Badania zakończyły się sukcesem. Doktorantce udało się znaleźć szereg wysoce aktywnych donorów reszty cholesterolu i innych steroidów, które zapewniły wysoką wydajność reakcji elektrochemicznego sprzęgania z reagentami cukrowymi. O jakości pracy świadczy również fakt opublikowania wyników uzyskanych w trakcie jej wykonywania w czterech artykułach zamieszczonych w bardzo dobrych czasopismach.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz 595). Składam więc do Rady Naukowej Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Anety Marii Tomkiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

