



**Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr Anety Marii Tomkiel**

**pt.: „Elektrochemiczna synteza pochodnych cukrowych  $\Delta^5$ -steroidów”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anety Marii Tomkiel wykonana została w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka W. Morzyckiego. Przedstawiona mi do recenzji dysertacja liczy 125 ponumerowanych stron, w tym wstęp oraz przegląd literaturowy zajmują 33 strony, opis badań własnych 36 stron i końcowa część eksperymentalna 45 stron. Ponadto zamieszczony jest spis 179 pozycji literaturowych. Praca doktorska, posiadająca bardzo staranną szatę graficzną, dotyczy elektrochemicznej syntezy pochodnych cukrowych steroidów, posiadających wiązanie podwójne pomiędzy węglem piątym i szóstym. Należy więc uznać, że opisane w recenzowanej pracy badania mgr Anety Tomkiel pozostają w ścisłym związku ze steroidową tematyką badawczą, realizowaną od szeregu lat przez członków zespołu prof. Jacka Morzyckiego i jego współpracowników.

Przedstawię teraz moją opinię o kolejnych częściach recenzowanej pracy. Na samym początku tekstu znajduje się zestaw skrótów stosowanych w tekście dysertacji. Po zwięzłym przedstawieniu celu i założeń pracy, Doktorantka rozpoczyna przegląd literaturowy, zaczynając od omówienia związku steroidowego odgrywającego ważną rolę w jej badaniach, a mianowicie cholesterolu. Sporo uwagi poświęca biosyntezie tego naturalnego sterolu, a także jego dalszym przemianom biochemicznym, prowadzącym do szeregu związków biologicznie czynnych o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania organizmów żywych, m.in. licznych hormonów. Następnie koncentruje się na procesach metabolicznych cholesterolu związanych z procesami jego nieenzymatycznego utleniania, które w przeciwieństwie do utleniania enzymatycznego, zachodzą w wyniku działania reaktywnych form tlenu (ROS) i prowadzą do oksysteroli, wywierających negatywny wpływ na działanie organizmu. Tak więc, na przykład rodnik wodorotlenowy atakuje głównie pozycję C-7 tworząc  $7\alpha$ - i  $7\beta$ -hydroperoksycholesterole, ulegające dalszym przemianom w odpowiednie 7-hydroksy związki oraz izomeryczne 5,6-epoksydy, z których następnie powstaje wyjątkowo toksyczny  $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol. Doktorantka

omawia następnie czynniki wpływające na powstawanie oksysteroli oraz ich różnorodne działanie biologiczne, takie jak stres oksydacyjny, stany zapalne, miażdżyca i działanie cytotoksyczne.

Po omówieniu tych biologicznych aspektów utleniania cholesterolu Doktorantka przechodzi do reakcji chemicznych (czasem enzymatycznych) rozpoczynając od omówienia różnorodnych metod utleniania tego związku w pozycji 3, a prowadzących do ketonu, jak również produktów o charakterze enonów, endionów, dienonów, itp. Przegląd metod jest wyczerpujący, podawane są najważniejsze odczynniki i warunki reakcji. Równie dokładnie i starannie omówione są procesy utleniania cholesterolu w pozycjach allilowych oraz jego wiązania podwójnego C(5)-C(6). Przy tej okazji Doktorantka szczegółowo omawia zarówno pierwotne, jak i wtórne produkty utleniania, szczególną uwagę zwracając na działanie tlenu trypletowego ( $^3\text{O}_2$ ) i bardziej reaktywnego tlenu singletowego ( $^1\text{O}_2$ ). Następnie omówione są metody utlenienia łańcucha bocznego cholesterolu, zaczynając od autooksydacyjnych a skończywszy na enzymatycznych. Istotna część przeglądu literatury jest poświęcona elektrochemicznemu utlenianiu cholesterolu; omówione są reakcje z użyciem pośredników redoks oraz metody bezpośrednie. W końcowej części rozdziału pojawia się wzmianka o pierwszych, niezbyt jeszcze wydajnych próbach elektrochemicznej syntezy pochodnych cukrowych cholesterolu, podjętych w 2010 r. przez zespół badawczy prof. Morzyckiego.

Rozdział „*Badania Własne*” rozpoczyna Doktorantka od prezentacji elektrolizera przeponowego, stosowanego podczas wykonywania preparatywnych elektroliz. Następnie, opisuje swe pierwsze syntezy i reakcje elektrochemicznego utleniania. Jak się okazuje, zachęcona doniesieniami literaturowymi na temat tioglikozydów, postanowiła swe wstępne eksperymenty przeprowadzić z aromatycznymi sulfidami cholesterolu i *i*-cholesterolu. Tak więc, wychodząc z cholesterolu otrzymała sulfid cholesterylowo-fenyłowy (**81**), z którego w wyniku elektrolizy prowadzonej w obecności 1,2:3,4-di-*O*-izopropylideno- $\alpha$ -D-galaktopiranozy (**77**) udało się otrzymać oczekiwany glikokoniugat **78**, z niewielką jednak wydajnością; w mieszaninie reakcyjnej pozostawała znaczna ilość substratu. Oprócz tego pożądanego produktu Doktorantka wyizolowała także jego *i*-steroidowy izomer **82** oraz difenyłowy sulfid, którego obecność potwierdzała generowanie podczas reakcji rodnika  $\text{PhS}^{\cdot}$ . Doktorantka zdecydowała się więc na zbadanie aktywności sulfidu *i*-cholesterylowo-fenyłowego (**84**), który także uzyskała z cholesterolu. Okazało się, że reakcja elektrochemicznego utleniania tego związku była znacznie bardziej wydajna i oczekiwany glikokoniugat **78** udało się otrzymać z 40% wydajnością. Doktorantce udało się także wyizolować z mieszaniny reakcyjnej szereg innych produktów i ustalić ich struktury. Pomimo zmieniania warunków elektrolizy (natężenie prądu, czas) nie udało



się już podwyższyć wydajności pożądanego związku. Ciekawym eksperymentem było zastosowanie w reakcji nadmiaru substratu steroidowego, bowiem w wyniku tej zmiany zmniejszyła się wydajność glikokoniugatu **78** na korzyść sulfidu cholesterylowo-fenylowego (**81**). Ten z pozoru zaskakujący wynik udało się Doktorantce przekonywająco wyjaśnić analizując prawdopodobny mechanizm izomeryzacji. Wyciągając z omówionych powyżej eksperymentów wniosek o większej aktywności pochodnej *i*-steroidowej, Doktorantka postanowiła przebadać sulfid *i*-cholesterolowo-*p*-tolilowy mając nadzieję, że „zablokowanie pozycji *para* w pierścieniu aromatycznym przez grupę metylową zmniejszy ilość reakcji ubocznych”. Przyznam, że przesłanki, którymi się kierowała Doktorantka stawiając te hipotezę nie za bardzo do mnie przemawiają, faktem jest jednak, że w wyniku reakcji elektrochemicznego utleniania sulfidu **87** udało jej się uzyskać znacznie większą wydajność pożądanego glikokoniugatu **78**. I właściwie bez zastrzeżeń należałoby przyjąć za Doktorantką, że „sulfid *i*-cholesterylowo-*p*-tolilowy (**87**) był aktywniejszym donorem niż sulfid *i*-cholesterolowo-fenylowy” gdyby eksperymenty z obydwoma sulfidami (minimalnie przecież różniącymi się budową) prowadzone były w takich samych warunkach. Niestety, z porównania Tabel 2 i 3, podsumowujących badane procesy elektrochemicznego utleniania wynika, że nie przeprowadzono dla porównania ani jednego eksperymentu z identycznym czasem reakcji i natężeniem użytego prądu. Uwaga ta odnosi się także do kolejnych opisanych w pracy eksperymentów i kolejnych Tabel. I tym razem przeprowadzono utlenianie z nadmiarem sulfidu **87** w stosunku do cukru **77**, uzyskując zmniejszenie wydajności produktu **78**, co Doktorantka wytłumaczyła, podobnie jak poprzednio, skłonnością *i*-steroidów do izomeryzacji. Prawdopodobnie ma rację, lecz w tym przypadku wydajność produktu ubocznego, tzn. sulfidu cholesterylowo-*p*-tolilowego (**88**) była niemal identyczna, jak w przypadku „optymalnego” eksperymentu 1 (Tabela 3).

Kolejne przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty udowodniły, że dobry donor sulfidowy **87** w reakcjach z cukrami posiadającymi trudniej dostępne, drugorzędowe grupy hydroksylowe, nie gwarantuje już tak dobrych wydajności odpowiednich glikokoniugatów lub glikozydów. Następnie Doktorantka otrzymała na drodze syntetycznej *i*-steroidowe pochodne innych  $\Delta^5$ -steroidów (diosgeniny i cholenianu metylu) i poddała je elektROUTlenianiu w obecności cukru **77**, uzyskując odpowiednie glikokoniugaty z umiarkowanymi wydajnościami. Obserwacje te, dane literaturowe oraz oczywiste niedogodności wynikające z operowania układami *i*-steroidowymi, skłoniły ją do przebadania jako donorów pochodnych selenowych cholesterolu. Badania te rozpoczęła syntezą selenku *i*-cholesterylowo-fenylowego (**104**) oraz cholesterylowo-fenylowego (**87**); podstawniki selenowe przy C-3 i C-6 miały w tych związkach  $\alpha$ -konfigurację,

sugerującą mechanizm  $S_N2'$  ich powstawania. Elektrotlenianie tych związków w obecności cukru **77**, przeprowadzane znów w odmiennych warunkach niż poprzednio stosowane, zachodziło w miarę wydajnie (33% wydajność **78**) tylko dla pierwszego z nich. Dość nieoczekiwanie, Doktorantka stwierdziła, że sam izomer cholesterolu, tzn. *i*-cholesterol, całkiem dobrze sprawdza się w charakterze donora – uzyskano 47% wydajność glikokoniugatu **78**. Skłoniło ją to do otrzymania i przebadania innych pochodnych *i*-steroidowych eterów (z podstawnikami alkilowymi, aryłowymi, silylowymi, itp.), jako donorów w elektrochemicznej glikozylacji. Okazało się, że wszystkie te związki, z wyjątkiem eteru *p*-hydroksyfenylowego **110**, okazały się dobrymi donorami cholesterylu tworząc glikokoniugat **78** z wydajnościami 40-58%. Doktorantka zasugerowała mechanizm powstawania tych produktów, jak też niepożądanych produktów ich izomeryzacji. Nie kwestionując poprawności tego mechanizmu, wydaje mi się, że jeśli tylko on odpowiadałby za powstawanie produktów, to przy przejściu od eteru metylowego **111**, poprzez eter etylowy **112** i izopropylowy **113**, wydajność produktu izomeryzacji powinna spadać (zwiększona zawada steryczna, tak jak w przypadku eteru silylowego **114**), natomiast wydajność związku **78** wzrastać. Takich zależności jednak nie widać w Tabeli 5 i pożądany byłby w tym miejscu jakiś komentarz.

W kolejnym podrozdziale pracy Doktorantka opisuje kontynuowanie poszukiwań dobrego donora cholesterylu, tym razem koncentrując swe wysiłki na otrzymaniu i przebadaniu łatwo dostępnych eterów cholesterylowych: alkilowych, arylowych i silylowego. Niestety, przebadanie ich reakcji elektrotleniania w obecności cukru **77** wykazało bierność tych związków w zastosowanych zakresach potencjału. Wypada zgodzić się z Doktorantką, że w przypadku eteru *t*-butylowego i silylowego sugerować można odmienny mechanizm reakcji, zakładający rozpad powstałych kationorodników z powstaniem trwalszych, trzeciorzędowych karbokationów.

Kolejnymi przebadanymi donorami cholesterylu były: tiocyjanian i merkaptan cholesterylu; wśród produktów wyizolowanych po elektrolizie drugiego z nich znalazł się disulfid cholesterylowy (**129**) oraz podwójnie podstawiony ugrupowaniem tiocholesterylowym cukier **130**. Po tych niezbyt udanych próbach znalezienia odpowiednich donorów, Doktorantka otrzymała i przebadła szereg estrów oraz halogenków cholesterylowych, które także okazały się niereaktywne. Pewnym sukcesem (17% wydajność glikokoniugatu **78**) był wynik reakcji jodku cholesterylu (**127b**), którego elektroliza przeprowadzana była w obecności mediatora -  $Co(ClO_4)_2$ . Znaczącym natomiast sukcesem zakończyły się próby zastosowania trichloroacetoiminyłowego donoru cholesterylu, tzn. trichloroacetoimidanu cholesterylu (**131**). Elektrotlenianie tego związku w obecności cukru **77** pozwoliło na uzyskanie glikokoniugatu **78**



z wydajnością 32%, a przy użyciu dwukrotnego nadmiaru steroidu w stosunku do cukru osiągnięto aż 57% wydajność pożądanego produktu. Doktorantka przedstawiła sugerowany mechanizm elektrotleniania związku **131**, zakładający tym razem odszczepienie małych cząsteczek.

Kończącym fragmentem badań własnych było przetestowanie trzech różnorodnych pochodnych fosforanowych cholesterylu (związki **132-134**); w przeciwieństwie do pierwszego z nich, obie pochodne – dimetylofosforan(III) (**133**) oraz difenylofosforan(V) (**134**) okazały się wyjątkowo dobrymi donorami cholesterylu, dając w reakcjach elektrotleniania glikokoniugat **78** odpowiednio z 46 i 54% wydajnością. Gorsze rezultaty Doktorantka uzyskała badając anodowe utlenianie innych fosforanowych pochodnych steroidów, np. diosgeniny. Fosforan **134** okazał się za to użyteczny jako donor w syntezie glikozydów. Wynik tego eksperymentu zachęcił Doktorantkę do sprawdzenia przebiegu jego elektrotleniania w obecności cukrów posiadających kilka grup hydroksylowych. Ponieważ okazało się, że preferencyjnie ulega reakcji ugrupowanie pierwszorzędowego hydroksylu, skoncentrowała najpierw swą uwagę na 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glukozie (**148**), posiadającej trzy drugorzędowe grupy hydroksylowe. W wyniku reakcji elektrochemicznej powstała złożona mieszanina produktów, m.in. mono-, di- oraz tricholesterylowanych. Doktorantce udało się rozdzielić te związki i ustalić ich budowę, głównie na podstawie dokładnej analizy ich widm rezonansu magnetycznego, jedno- i dwuwymiarowych. Zwłaszcza rezonans węglowy tych połączeń okazał się użyteczny, dokonane przez Doktorantkę porównanie przesunięć chemicznych węgli z części cukrowej w elegancki sposób dowodziło, które pozycje uległy cholesterylacji. Kolejnym przebadanym cukrem był metyloglukozyd **150**, w którego cząsteczce oprócz trzech drugorzędowych hydroksyli był także pierwszorzędowy. I ta próba zakończyła się powodzeniem – anodowe utlenianie fosforanu **134** w obecności tego związku prowadziło – tak jak tego można było oczekiwać – do bardzo skomplikowanej mieszaniny produktów, z której jednak udało się Doktorantce wyodrębnić i zidentyfikować produkty mono-, di-, tri-cholesterylowane oraz tetracholesterylowane.

W podsumowaniu badań własnych Doktorantka słusznie podkreśliła, że opracowana przez nią metoda syntezy pochodnych cukrowych z zastosowaniem fosforanowych pochodnych cholesterolu umożliwia wydajne otrzymywanie nie tylko glikozydów ale również glikokoniugatów, stanowiąc przy tym jedyną metodę jednoetapowej syntezy związków, zawierających kilka reszt cholesterylowych przyłączonych do cząsteczki cukru. Nie może więc dziwić znaczny dorobek publikacyjny Doktorantki – Jej badania związane z przedstawioną dysertacją opublikowane zostały w czterech artykułach, w recenzowanych czasopismach naukowych o znacznym współczynniku oddziaływania (IF).

Po bardzo zwięzłym podsumowaniu wyników rozpoczyna się część eksperymentalna, w której - oprócz opisów doświadczeń - Doktorantka zamieściła dane widmowe otrzymanych związków. Z dużym uznaniem należy podkreślić zamieszczenie dokładnych opisów widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR (wraz ze szczegółową interpretacją poszczególnych sygnałów), widm w podczerwieni, a także widm masowych (szkoda że nie wysokorozdzielczych), dowodzących prawidłowości przypisanych struktur. O biegłości Doktorantki w tym zakresie świadczy choćby dokładne zinterpretowanie widm NMR cukru podstawionego czterema ugrupowaniami cholesteryłowymi (związku **151a**), natomiast o Jej biegłości eksperymentalnej niezwykle staranne wykonywanie niełatwych eksperymentów preparatywnych elektroliz oraz wykrywanie niektórych związków i otrzymanie kryształów o jakości odpowiedniej do wykonania rentgenowskiej analizy strukturalnej.

Praca napisana jest poprawnym językiem, jednak czytelnik napotyka czasami niezbyt zgrabne stylistycznie zdania, takie jak np. na str. 31, zaczynające się od "O2 Był aktywowany".

Z obowiązku recenzenta wymienię teraz pewne usterki omawianego przeze mnie tekstu:  
str. 14: Doktorantka podaje w tekście pracy (str. 14 i dalsze) systematyczne nazwy epoksydów w konwencji  $5\alpha,6\alpha$ -epoksy, a nie  $5,6\alpha$ -epoksy (tak podała np. na Schemacie 5); ta druga wydaje mi się bardziej prawidłowa.

str. 20: dienon **26** można istotnie przekształcić w 7-dehydrocholesterol (odn. 59) ale wydajność nie jest za wysoka, bo w końcowym etapie redukcji powstaje mieszanina  $3\alpha$ - i  $3\beta$ -epimerów

str. 27: dlaczego kolejność związków **45-49** na Schemacie 16 jest taka, że **49** poprzedza **48**; tego typu numeracja powtarza się na szeregu następnych schematach i w tabelach (np. związki **108-113** na Schemacie 45, związki **108-114** na Schemacie 48 i w Tabeli 5)

str. 30: w podpisie pod Schematem 20 lepsze byłoby „utleniania łańcucha” zamiast „odłączania łańcucha”

str. 33, ostatni wiersz: jon bromoniowy był produktem pośrednim

str. 43: na Schemacie 32 stosunek produktów **84** do **81** jest podany jako 50:9, a w tekście powyżej jako 7:1

str. 57: na Schemacie 50 nad strzałką powinien być substrat steroidowy **120**, a nie **110**

str. 71, ostatnie trzy wiersze: z przedstawionych Tabel 10 i 11 nie wynika, aby zdanie „Sygnały pochodzące od atomów węgla, przy których nastąpiło podstawienie przesuwają się w stronę niższych wartości  $\delta$  (ppm) w porównaniu do niepodstawionego cukru” było prawdziwe; wydaje się, że jest na odwrót.

Recenzowana dysertacja doktorska zawiera bogaty i interesujący materiał eksperymentalny. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania naukowe wskazują, moim



zdaniem, na pełną dojrzałość naukową Autorki. Na podkreślenie zasługuje podawanie przez Nią prawdopodobnych mechanizmów badanych reakcji. Bez wątpienia taką konkluzję potwierdza też fakt umiejętnego poszukiwania przez Doktorantkę wydajniejszych metod przeprowadzania takich procesów, które charakteryzowały się niską wydajnością. Jeszcze raz należy pochwalić w tym miejscu Jej niezwykle sprawne rozdzielanie skomplikowanych mieszanin reakcyjnych i staranną analizę danych spektroskopowych uzyskanych produktów, pozwalającą na przeprowadzenie - nie budzące żadnych wątpliwości - ich identyfikacji. Jestem przekonany, że opracowana przez Nią i zbadana stereoselektywna metoda elektrochemicznej cholesterylacji pochodnych cukrowych stanowi istotny wkład zarówno do chemii steroidów, jak i cukrów.

W konkluzji stwierdzam z całym przekonaniem, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z dnia 14 marca 2003 roku oraz wnoszę o dopuszczenie mgr Anety Marii Tomkiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 8.09.2016 r.



Prof. dr hab. Rafał R. Siciński

tel. 22 55 26 252

e-mail: rasici@chem.uw.edu.pl