



**Instytut Chemii Organicznej**  
Polskiej Akademii Nauk

**dr hab. Zbigniew Pakulski, prof. IChO PAN**

tel.: +48 22 343 20 05, fax: +48 22 632 66 81  
zbigniew.pakulski@icho.edu.pl  
ul. M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa  
www.icho.edu.pl

Warszawa, 05 listopada 2020

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr Urszuli Kielczewskiej** ***Synteza analogów alkaloidów steroidowych***

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Urszuli Kielczewskiej została wykonana w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Wojtkielewicz, prof. UwB, w bardzo dobrym laboratorium, przygotowanym do prowadzenia zaawansowanych badań w dziedzinie chemii steroidów.

Jej celem było wykorzystanie diosgeniny, łatwo dostępnej sapogeniny steroidowej do syntezy homosolasodyny, jej analogu azotowego oraz otrzymanie pochodnych pregnenolonu zawierających resztę benzimidazolu. Praca ta wpisuje się logicznie w tematykę realizowaną od wielu lat w Zakładzie Chemii Produktów Naturalnych. Wybór tematu badań uważam za trafny. Wysoka cytotoksyczność solasodyny, abirateronu czy galeteronu zachęca do syntezy ich pochodnych i zbadania własności biologicznych, z nadzieją znalezienia związków potencjalnie użytecznych w terapii. Dodatkowym atutem jest dostępność wyjściowej diosgeniny.

Praca została przygotowana w tradycyjnej formie. Liczy 153 strony i składa się z trzech głównych części – części teoretycznej, omówienia wyników badań własnych i części eksperymentalnej. Praca zawiera również krótkie streszczenie po polsku i angielsku oraz przedstawienie celu pracy. Spis literatury liczy 242 pozycje. Większość przywołanych w odnośnikach prac oryginalnych została opublikowana pod koniec poprzedniego stulecia lub w XXI wieku, co potwierdza aktualność zaproponowanej tematyki rozprawy doktorskiej.

Przegląd literatury Autorka rozpoczęła od omówienia występowania i własności biologicznych alkaloidów *Solanum*, poświęcając najwięcej uwagi solasodynie. Następnie omówiła znane w literaturze metody syntezy solasodyny, w których najczęściej wykorzystywano otwarcie pierścienia F w spirostanach, wprowadzenie atomu azotu i ponowne zamknięcie pierścienia F, tym razem zawierającego już atom azotu zamiast atomu tlenu. Rozdział kończy się omówieniem reaktywności pierścienia F w solasodynie i jej analogach. Zebrany materiał można uznać za wystarczający do zrozumienia stojących przed Doktorantką wyzwań badawczych. Z obowiązku recenzenta zamieszczam kilka drobnych uwag dotyczących tego fragmentu pracy (pomijam nieistotne błędy interpunkcyjne i literówki):

- str. 25 – niezręczne sformułowanie "opisaną przeze mnie metodę syntezy" – powinno być raczej "opisaną powyżej";

- str. 42 – "dotycząca totalnej syntezy solamarginy" – pojęcie totalnej syntezy ma zdecydowanie inne znaczenie niż połączenie (nawet trudne preparatywnie) steroidu z resztą cukrową, jest to synteza z prostych substratów. Doktorantka padła tutaj zapewne ofiarą Autorów cytowanej publikacji, którzy syntezę totalną umieścili w tytule pracy;

- str. 13-14 – "tomatydyna różni się od solasodyny ... konfiguracją grupy metylowej ... przy 25 atomie węgla" – powinno być "konfiguracją absolutną na 25 atomie węgla", po pierwsze trudno bowiem mówić w tym przypadku o konfiguracji grupy metylowej, a po drugie zmienia się jedynie konfiguracja absolutna na atomie C25 – budowa przestrzenna pozostaje taka sama;

- str. 14, rysunek 6 – błędne wzory ramnozy;

- str. 14, 15, 44 - w niektórych wzorach piranoz wiązania narysowane są w dość przypadkowych kierunkach. Tymczasem ich położenie jest ściśle określone budową przestrzenną cukrów (czy ogólniej – cykloheksanu) i regułami opisującymi sposób rysowaniu wzorów krzesłowych.

Kolejny rozdział p.t. *Badania własne* rozpoczyna opis prób bezpośredniego przekształcenia diosgeniny w solasodynę przez zamianę atomu tlenu na atom azotu w jednym etapie. Zadanie ambitne – do tej pory udało się to bodaj tylko jednej grupie (Tian, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 6639) i to z niewielką wydajnością. Pierwsze próby z udziałem azydru trimetylosililu doprowadziły do otrzymania nitrylu i diazydku. Doktorantka wyjaśniła mechanizm tworzenia się tych nieoczekiwanych produktów. Następnie przeprowadziła optymalizację procesu otrzymując nitryl **152** z wydajnością 40% jako jedyny produkt. Szkoda, że Doktorantka nie wykonała chociaż wstępnej próby syntezy solasodyny z nitrylu **152**. Wysiłek włożony w optymalizację reakcji i wydajność nitrylu były wystarczająco duże, żeby pokusić się o przeprowadzenie kilku eksperymentów.

Następnie, Doktorantka podjęła próby wykorzystania karbaminianów w syntezie solasodyny. Jako pierwszy zastosowała karbaminian *tert*-butylu, jednak konwersja substratu była bardzo niska. Dopiero jego zamiana na karbaminian metylu, a szczególnie karbaminian benzylu, pozwoliła na otrzymanie pożądanego produktu z dobrą wydajnością. W obu reakcjach powstają również znaczące ilości laktoli (**164** i **166**), które po odwodnieniu zwiększają wydajność produktów głównych. Ta procedura nie została jednak opisana w części eksperymentalnej. Również opis wyników jest niespójny. Wg. Tabeli 4 wydajność produktu **165** wynosi 52%, na Schemacie 60 rośnie do 57%. Czy to wydajność sumaryczna po doliczeniu produktu dehydratacji laktolu **166**? Rezygnacja z oczyszczania mieszaniny preakcyjnej z karbaminianem benzylu i cyklizacja surowego produktu pozwoliła na znaczne zwiększenie wydajności solasodyny. W porównaniu ze znanymi metodami syntezy tego związku, procedura zastosowana przez Doktorantkę prezentuje się bardzo dobrze. Tylko jedna metoda zapewnia wyższą wydajność, ale kosztem 5 etapów więcej.

Niepowodzeniem zakończyła się za to synteza z wykorzystaniem amidku diizobutyloglinowego. Diosgenina była niereaktywna, natomiast tigogenina dawała pochodne z atomem azotu w pierścieniu E oraz pochodne karbocykliczne.

W następnym kroku Doktorantka podjęła się syntezy 26a-homosolasodyny. Nie rozumie próby uzasadnienia podjęcia się tej syntezy powołaniem się na przykład asterasteroidu A, który ma siedmioczłonowy pierścień B, a więc zupełnie różny od badanych pochodnych. Potrzebny do syntezy nityryl Doktorantka otrzymała z bardzo dobrą wydajnością, choć wymagało to starannego doboru warunków reakcji. Nityryl, po redukcji do aminy, został poddany cyklizacji do pożądanego homologu z wydajnością 53%, znowu po żmudnej optymalizacji procesu. Niestety, powstawała mieszanina epimerów, których nie udało się rozdzielić. Przy okazji, Doktorantka zaobserwowała, że N-acylowanie otrzymanej mieszaniny prowadzi do epimeryzacji i powstaje wyłącznie 22-epi-homosolasodyna. Wyjaśniła również pochodzenie tego fenomenu przeprowadzając obliczenia kwantowo-mechaniczne, które potwierdziły preferencje energetyczne dla tego izomeru.

22a(N)-Homosolasodyna została natomiast otrzymana z 22-nityrylu, produktu reakcji diosgeniny z TMSCN. Tutaj również konieczna była optymalizacja procesu tak, aby uniknąć tworzenia *i*-steroidu. Redukcja grupy CN do aminy i cyklizacja dostarczyły pożądaną 22a(N)-homosolasodynę z dobrą wydajnością. Doktorantka wykorzystwała opracowaną metodę syntezy do otrzymania również nasyconego analogu homosolasodyny, czyli 22a(N)-homosoladulcydyny.

Aktywność biologiczna otrzymanych związków została przetestowana w laboratorium prof. Strnada (Ołomuniec). Kilka pochodnych wykazało znaczną aktywność przeciwnowotworową. Szkoda, że dla części związków nie wykonano pomiarów toksyczności wobec normalnych komórek. Jest to parametr decydujący o możliwości ich zastosowania w terapii. Zbadano również ich zdolność hamowania cholinoesteraz, uzyskując w kilku przypadkach bardzo obiecujące wyniki.

Ostatnim zadaniem, którego podjęła się Doktorantka, była synteza steroidów podstawionych resztą benzimidazolu. Mam wrażenie, że ta część badań, w porównaniu z poprzednimi syntezami, była łatwa, lekka i przyjemna. Mimo konieczności optymalizacji warunków reakcji, powstawały raczej oczekiwane produkty, a główne problemy wynikały z trudności z udowodnieniem ich budowy. Testy biologiczne wykazały wysoką aktywność przeciw liniom komórkowym raka prostaty. Niestety, brakuje danych o ich toksyczności względem normalnych komórek.

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 syntezy, tym bardziej, że numeracja związków nie zawsze odpowiada kolejności ich syntezy. Brakuje pomiarów skręcalności optycznej. W kilku przypadkach nie zostały zmierzone widma HR-MS (np. **152**, **153**, **192**, **197**, **208**). Czasami, w analizie budowy produktów reakcji pomocna bywa staroświecka analiza elementarna, np. diazydki **153**, który przysporzył sporo problemów przy analizie. Zwyczajowo, przy wydzielaniu kilku produktów, wymienia się je w kolejności wymywania z kolumny chromatograficznej.

Sądząc z opisu preparatywnego, ta zasada nie została zachowana dla związków **152** i **153** oraz **1b** i **11b**. W procedurze **3.3.2.** pominięty został chyba etap deaktywacji reduktora i odparowania rozpuszczalników; ekstrakcja octanem etylu z THF nie zakończy się sukcesem. Nie znalazłem również opisu syntezy związku **4c**. Są to oczywiście drobne uwagi; analizy i opisy procedur są na ogół kompletne. W spisie literatury data publikacji pozycji [166] powinna być: 2003 rok.

W *Podsumowaniu* Autorka wymieniła najważniejsze osiągnięcia i zebrała wnioski wynikające z przeprowadzonych badań. Niewątpliwie, Doktorantka wykonała olbrzymią pracę poszukując nowych metod syntezy sapogenin steroidowych. W zdecydowanej liczbie przypadków syntezy zakończyły się sukcesem. Doktorantka opisała nowe, konkurencyjne do znanych metod, procedury syntezy i opracowała syntezę nieznanymi analogów. Uważam, że założone cele zostały osiągnięte. Otrzymane wyniki badań biologicznych potwierdziły obiecującą aktywność biologiczną syntezowanych pochodnych. Większość wyników została już opublikowana w sześciu publikacjach w dobrych czasopismach. Doktorantka jest także współautorką trzech publikacji, tematycznie niezwiązanych z rozprawą doktorską. Jest to duże osiągnięcie warte podkreślenia.

Na uwagę zasługuje strona edytorska rozprawy. Błędy literowe są nieliczne, praktycznie nie pojawiają się uchybienia w interpunkcji czy niezręczności stylistyczne. Autorka uniknęła także stosowania żargonu naukowego. W dwóch lub trzech miejscach Doktorantka odwołuje się do niewłaściwych schematów lub numerów związków. Błędy, które udało mi się dostrzec, nie wpływają na wartość merytoryczną pracy i nie warto poświęcać im czasu. Tekst czyta się dobrze, choć zdarzają się nieco zagmatwane fragmenty, wymagające chwili skupienia do pełnego zrozumienia toku myśli Autorki. Także pod względem merytorycznym nie mam do przedstawionej pracy żadnych zastrzeżeń.

Przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Urszuli Kiełczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Zbigniew Pakulski