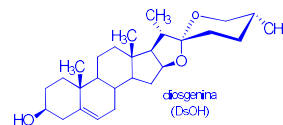


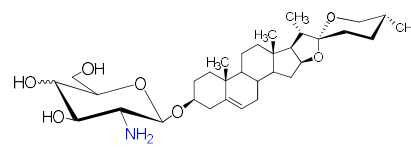
## Synteza i właściwości D-glikozaminy diosgeniny

Saponiny to zróżnicowana pod względem strukturalnym grupa glikozydów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, głównie w królestwie roślin. Najczęściej spotykanymi saponinami naturalnymi są saponiny triterpenoidowe i steroidowe. Wśród glikozydów steroidowych wyróżnia się saponiny cholestanowe, furostanowe i spirostanowe. Należące do ostatniej klasy są szczególnie ważne z uwagi na szerokie spektrum właściwości biologicznych. Większość saponin została wyodrębniona z preparatów ziołowych stosowanych w medycynie ludowej, szczególnie w krajach Azji. W postaci ekstraktów ziołowych, maści, różnego rodzaju naparów są tam stosowane jako leki przeciw malarii, odtrutki przeciwko jadom węży i owadów oraz jako środki antyseptyczne, bakteriobójcze i przeciwwirusowe. Aglikon, czyli saponinę stanowi w nich m.in. diosgenina.



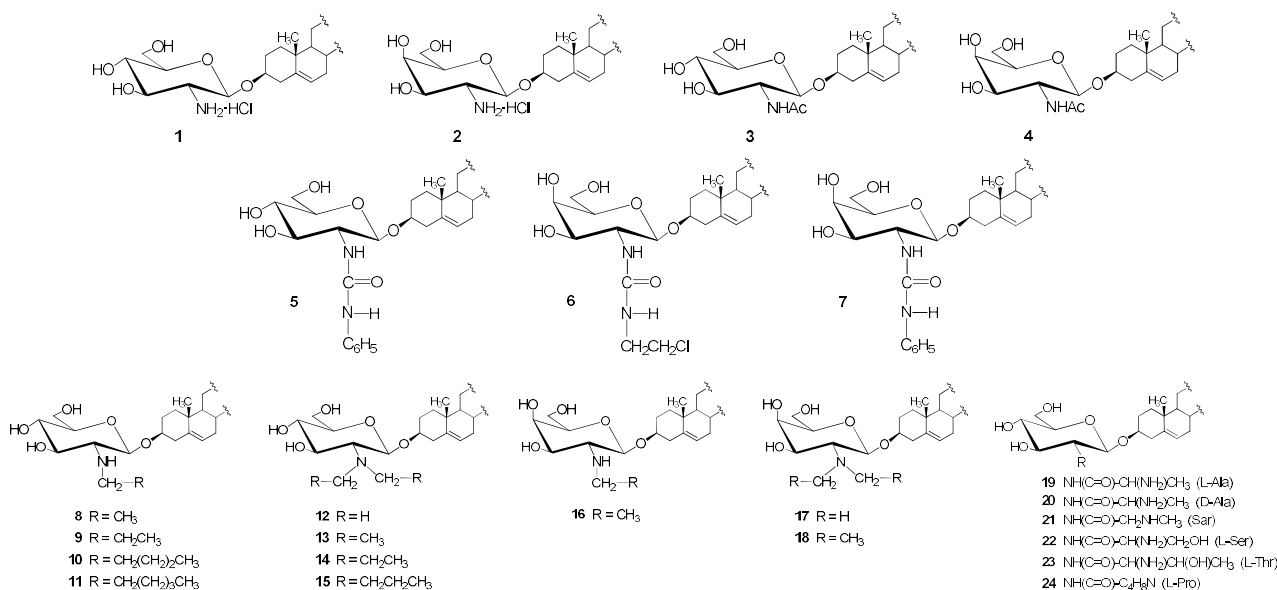
Fragment hydrofilowy saponin składa się zwykle z jednej lub kilku jednostek cukrowych. Najczęściej spotykanymi sacharydami wchodzącymi w ich skład są D-glukoza (D-Glc) i L-ramnoza (L-Rha).[1]

W naszym laboratorium uzyskaliśmy serię D-glikozaminy diosgeniny (Rys. 1) zawierających jako fragmenty cukrowe resztę D-glikozaminy lub D-galaktozaminy. Takie saponiny nie występują w naturze. Ich synteza polega na umiejętnym połączeniu chronionej D-glikozaminy – stanowiącej donor glikozydu – z akceptorem glikozydu, tj. diosgeniną. Do osłony grupy aminowej najczęściej stosowaliśmy osłonę tetrachloroftaloilową, a grupą odchodzącą przy anomerycznym atomie węgla był anion halogenowy.[2-5] Po uzyskaniu glikozydu, następnym etapem było usunięcie osłon acetylowych i osłony z funkcji aminowej.



Rys. 1.

W kolejnych etapach dokonaliśmy funkcjonalizacji grupy aminowej. Otrzymaliśmy kilkadziesiąt pochodnych, m.in. chlorowodorki **1** i **2**, pochodne acetylowe **3** i **4**, z ugrupowaniem mocznikowym **5**÷**7**, kilka *N*-alkilowych – saponiny **8**÷**11** i **16**, *N,N*-dialkilowych – glikozydy **12**÷**15**, **17** i **18** oraz kilkanaście *N*-acylowych pochodnych zawierających reszty aminokwasów, m.in. D- i L-alaniny, sarkozyny, L-seryny, L-treoniny czy L-proliny – saponiny **19**÷**24** (Rys. 2).



Rys. 2.

Chlorowodorki zostały otrzymane po sprotonowaniu grupy aminowej roztworem HCl w MeOH. Procedury modyfikacji funkcji aminowej polegały na jej acetylowaniu bezwodnikiem octowym,

reakcji z komercyjnie dostępnymi izocyjanianami fenylu i 2-chloroetylu oraz redukcyjnym aminowaniem (reakcja z aldehydem i redukcja  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ). Natomiast do syntezy saponin z resztami aminokwasów wykorzystaliśmy klasyczną metodę syntezy w roztworze, polegającą na utworzeniu wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową aminokwasu bądź hydroksykwasu a funkcją aminową w D-glukozaminozydzie diosgenylu.

Uzyskane saponiny zostały w różnym stopniu przebadane pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej i/lub przeciwdrobnoustrojowej (bakterie i grzyby).

W najszerszym zakresie został zbadany chlorowodorkek 2-amino-2-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozydu diosgenylu (**1**). Badania przeciwnowotworowe chlorowodorke **1** i saponiny **5** polegały na określeniu ich wpływu na limfocyty wyizolowane z krwi pacjentów cierpiących na chłoniaka a leczonych 2-chlorodeoksyadenozyną (2-CDA, kladrybina). Obie saponiny wykazują cytotoksyczność wobec tych limfocytów.[2]

Kolejne badania *in vitro* i *in vivo* dla **1** przeprowadziliśmy na szczepach (referencyjnych i szpitalnych) bakterii Gram-dodatnich, ustalając minimalne stężenie hamujące w 50% i 90% ( $\text{MIC}_{50}$  i  $90$ ) oraz minimalne stężenie bakteriobójcze ( $\text{MBC}_{50}$  i  $90$ ). Badania prowadziliśmy dla szczepów metycylino- i wankomycyno-opornych (MR i VR) oraz metycylino- i wankomycyno-wrażliwych (MS i VS) gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) i paciorkowca kałowego (*Enterococcus faecalis*). Jako związki kontrolne stosowaliśmy ogólnodostępne antybiotyki, m.in. imipenem, doksyklicynę, erytromycynę, cyprofloksacynę. Wyniki badań dla saponiny **1** są porównywalne z rezultatami uzyskanymi dla wzorcowych antybiotyków. Zaobserwowaliśmy również, że stosowanie **1** z wankomycyną oraz daptomycyną prowadzi do uzyskania efektu synergistycznego wobec szczepów metycylino- i wankomycyno-wrażliwych (FIC w granicach  $0,312 \div 0,458$ ). Nie zaobserwowaliśmy efektu antagonistycznego.[6]

Biorąc pod uwagę rezultaty synergizmu przeprowadziliśmy badania *in vivo* na albinotycznym szczepie wsobnym myszy BALB/c. Jako antybiotyk referencyjny wybraliśmy wankomycynę. Największe bakteryjne zahamowanie uzyskaliśmy dla tkanki zakażonej gronkowcem lub paciorkowcem, która została potraktowana mieszaniną naszej saponiny i antybiotyku.[6]

Otrzymane saponiny badaliśmy również pod kątem zwalczania drobnoustrojów jakimi są grzyby. Tę aktywność badaliśmy na szczepach referencyjnych gatunków zaliczanych do drożdżaków *Candida albicans* i *Candida tropicalis*. [4,5] Wobec *Candida* najlepszą aktywność wykazała saponina **1** ( $\text{MIC} = 0,5$  i  $2 \mu\text{g/ml}$ , odpowiednio dla *C. tropicalis* i *C. albicans*). W następnej kolejności są trzy *N,N*-dialkilowe saponiny **12**–**15** o krótkich łańcuchach węglowych ( $1 \div 3$  atomów węgla) z  $\text{MIC} = 1 \div 4 \mu\text{g/ml}$ . Znacznie słabsze rezultaty otrzymaliśmy dla *N,N*-dialkilowych pochodnych o dłuższych łańcuchach węglowych ( $4 \div 6$  atomów węgla), a saponiny *N*-monoalkilowe **8**–**11** należy uznać za mało aktywne. Aktywność rzędu  $4 \mu\text{g/ml}$  wobec *C. albicans* wykazywała także większość pochodnych zawierających reszty aminokwasowe – **19**–**24**.

Podobne testy wykonaliśmy dla D-galaktozaminozydów. Zmiana konfiguracji atomu węgla C-4 w pierścieniu cukrowym wpłynęła niekorzystnie na aktywność chlorowodorke **2** w porównaniu z jego odpowiednikiem D-gluko, hamuje on wzrost obydwu grzybów w mniejszym stopniu (dla *C. tropicalis*  $\text{MIC} = 4 \mu\text{g/ml}$  a dla *C. albicans* zaledwie  $64 \mu\text{g/ml}$ ). Jedynie wyniki dla *N,N*-dialkilowych pochodnych (dietylo i dipropylo) serii D-gluko **13** i **14** oraz serii D-galakto **17** i **18** są porównywalne ( $\text{MIC} \sim 4 \mu\text{g/ml}$ ). Z kolei saponiny zawierające ugrupowania ureidowe (związki **6** i **7**) należy uznać za nieaktywne.

Chlorowodorek D-gluko **1** oraz cztery *N,N*-dialkilowe pochodne o krótkich łańcuchach (**12**–**15**) testowaliśmy dodatkowo na szpitalnych szczepach grzybów gatunku non-*albicans Candida*. [7] Rezultaty porównywaliśmy do wzorcowych środków przeciugrzybiczych, m.in. amfoterycyny B, klo-

trimazolu, flukonazolu, itrakonazolu. Gatunek *C. glabrata* (odporny na flukonazol i itrakonazol) okazał się być podatnym na saponiny **1**, **12** i **13**, które hamowały wzrost grzyba w 90% przy stężeniu 4 µg/ml i niższym. Aż 4 saponiny (**1** i **12**÷**14**) wykazały silną aktywność wobec gatunku *C. parapsilosis*.

Do badań przeciwbakteryjnych użyliśmy po kilka szczepów referencyjnych bakterii Gram-ujemnych, m.in. *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz Gram-dodatnich, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *S. epidermidis*. [4,5]

O ile wszystkie glikozydy okazały się nieaktywne w stosunku do bakterii G(-), to wobec bakterii G(+) większość *N*-alkilowych i *N,N*-dialkilowych saponin cechuje się dość różną aktywnością. Najaktywniejszymi okazały się pochodne *N*-etylowa (**8**) i *N*-propylowa (**9**), zarówno w serii D-gluko jak i D-galakto. Pochodne *N,N*-dialkilowe **12** i **13** wykazują słabszą aktywność od chlorowodoru **1** (MIC = 8÷16 µg/ml), a saponiny **14** i **15** lepszą. [4] O ile pochodne alkilowe serii D-galakto zachowywały się w podobny sposób do D-gluko, to nie można tego powiedzieć o chlorowodorach obydwu serii. [5] Otóż, chlorowodorek **2** cechuje się brakiem aktywności wobec bakterii G(+). Wśród saponin serii D-galakto warto zwrócić uwagę na aktywność pochodnej **6**, zawierającej przy atomie węgla C-2 fragment chloroetylomocznikowy (MIC = 2÷8 µg/ml).

Analizując wyniki aktywności pochodnych **19**÷**24**, zawierających reszty aminokwasów, okazuje się że najwyższą aktywność wykazuje pochodna *N*-(D-alanylowa) (**19**), nieco słabszą *N*-sarkozylowa (**21**), *N*-(L-alanylowa) (**20**) i *N*-(L-proliłowa) (**24**), a jeszcze słabszą pochodne zawierające reszty L-hydroksyaminokwasów, tj. *N*-(L-serylowa) (**22**) i *N*-(L-treonylowa) (**23**). [8]

Dodatkowo dla saponin **1**, **12**÷**15** i **19**÷**24** badaliśmy ich aktywność hemolityczną na ludzkich erytrocytach. Minimalne stężenie powodujące hemolizę (MHC) zostało ustalone jako najniższe stężenie, które powoduje przynajmniej 10±0,5% hemolizy. Wyniki badań hemolitycznych pokazały, że wymienione saponiny przy ich mikrobiologicznie aktywnych stężeniach są nietoksyczne dla ludzkich krwinek czerwonych. [7,8]

---

[1] H. Myszka, D. Bednarczyk, *Wiad. Chem.*, **2005**, 59, 275-303.

[2] H. Myszka, D. Bednarczyk, M. Najder, W. Kaca, *Carbohydr. Res.*, **2003**, 338, 133-141.  
[https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00407-X)

[3] D. Bednarczyk, A. Walczewska, D. Grzywacz, A. Sikorski, B. Liberek, H. Myszka, *Carbohydr. Res.*, **2013**, 367, 10-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.11.020>

[4] A. Walczewska, D. Grzywacz, D. Bednarczyk, M. Dawgul, A. Nowacki, W. Kamysz, B. Liberek, H. Myszka, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2015**, 11, 869-874. <https://doi.org/10.3762/bjoc.11.97>

[5] H. Myszka, P. Sokołowska, A. Cieślińska, A. Nowacki, M. Jaśkiewicz, W. Kamysz, B. Liberek, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2017**, 13, 2310-2315. <https://doi.org/10.3762%2Fbjoc.13.227>

[6] O. Cirioni, H. Myszka, M. Dawgul, R. Ghiselli, F. Orlando, C. Silvestri, L. Brescini, W. Kamysz, M. Guerrieri, A. Giacometti, *J. Med. Microbiol.*, **2011**, 60, 1337-1343.  
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.031708-0>

[7] M.A. Dawgul, D. Grzywacz, B. Liberek, W. Kamysz, H. Myszka, *Med. Chem.*, **2018**, 14, 460-467.  
<https://doi.org/10.2174/1573406414666180226164747>

[8] D. Grzywacz, M. Paduszyńska, M. Norkowska, W. Kamysz, H. Myszka, B. Liberek, *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, 27, 114923. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.05.036>