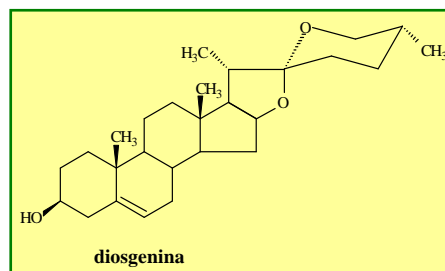


SYNTEZA CHLOROWODORKU O³-(2-AMINO-2-DEOKSY-β-D-GLUKOPIRANOZYLO)- DIOSGENINY I JEGO WYBRANYCH POCHODNYCH ORAZ BADANIA ICH WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH, PRZECIWBAKTERYJNYCH ORAZ PRZECIWGRZYBICZYCH

Glikozydy diosgenyłu należą do klasy związków zwanych saponinami. To zróżnicowana pod względem chemicznym grupa glikozydów szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, głównie w królestwie roślin, chociaż można je znaleźć w organizmach morskich. Część hydrofobową tych połączeń stanowi steroidowy aglikon – diosgenina, a fragment hydrofilowy – połączony wiązaniem O-glikozydowym z diosgeniną – składa się zwykle z jednej lub kilku jednostek cukrowych (najczęściej są to reszty D-glukozy, D-ksylozy i L-ramnozy). Od dawna znane są ich właściwości lecznicze. Wykorzystuje się je w medycynie ludowej, zwłaszcza Dalekiego Wschodu, jako leki przeciw malarii, odtrutki przeciwko jadom węży i owadów. Późniejsze badania potwierdziły ich właściwości antyseptyczne, hemolityczne, przeciwnowotworowe, bakteriobójcze i przeciwgrzybicze.



Trudności w walce z chorobami nowotworowymi są spowodowane, między innymi, brakiem dostatecznej znajomości czynników odpowiedzialnych za ich powstawanie i dlatego jedną z dróg zmierzających do ich pełnego poznania są prace nad nowymi substancjami cytostatycznymi. Jednak cytostatyczne działanie związków chemicznych bardzo często skierowane jest równocześnie przeciw komórkom nowotworowym i komórkom zdrowym. Selektywność działania jest zatem podstawowym kryterium wartości i przydatności leków w terapii antynowotworowej. Kluczowe znaczenie w efektywnym działaniu cytostatyków ma także ich penetracja do wnętrza komórki nowotworowej i dlatego związki ułatwiające wnikanie leków do komórek rakowych mogą odgrywać istotną rolę w terapii nowotworów. Związkami o takim działaniu mogą być między innymi glikozydy diosgenyłu.

Z kolei grzyby wywołują grzybice powierzchniowe (zakażenia skóry, włosów i inne), których leczenie jest długotrwałe. Gwałtownemu wzrostowi liczby infekcji grzybiczych towarzyszy wzrost oporności szczepów na skuteczne do tej pory leki. Drastyczny wzrost tych infekcji jest związany z wprowadzeniem antybiotyków o szerokim spektrum działania. Ich stosowanie narusza równowagę mikroflory człowieka, prowadząc do dysbakteriozy. Na początku lat 90-tych ub. wieku gwałtownie wzrosła liczba zakażeń bakteryjnych. Przykładem może być narastająca oporność pneumokoków, bakterii mogących wywołać sepsę i wiele zakażeń dróg oddechowych, zapaleń ucha i zatok. Leczenie tego typu zakażeń dostępnymi lekami jest trudne, długotrwałe, związane z licznymi objawami ubocznymi.

Celowe i konieczne są więc poszukiwania nowych skuteczniejszych leków, które będzie cechowała niższa toksyczność wobec komórek zdrowych.

Glikozydy diosgenyłu wyodrębniane są z materiału roślinnego, m.in. z roślin gatunku *Dioscorea*, *Paris*, *Costus* czy *Trillium*.



Costus speciosus



Trillium tschonoskii



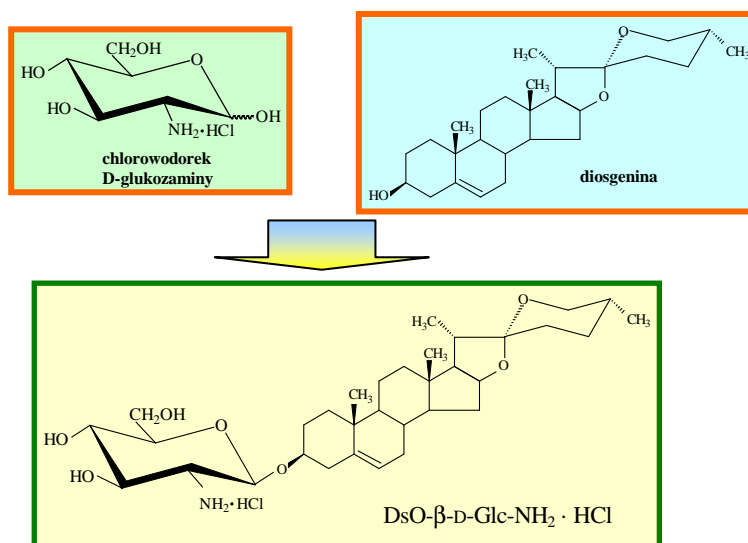
Dioscorea bulbifera



Paris polyphylla

Synteza chemiczna daje potencjalne możliwości uzyskania analogów nie występujących naturalnie. Metodami chemicznymi można zmodyfikować cząsteczkę glikozydu, na przykład przez wprowadzenie nowych grup funkcyjnych. Modyfikacje stwarzają potencjalne możliwości uzyskania wielu nowych leków, o korzystniejszych właściwościach terapeutycznych w porównaniu do substancji macierzystych. Zwykle większe możliwości modyfikacji istnieją w części cukrowej niż w aglikonie, szczególnie w przypadku gdy fragment sacharydowy zawiera grupy aminowe.

Saponiny zawierające we fragmencie sacharydowym aminocukry są rzadkością. Syntezę glikozydów diosgeniny, w których reszta D-glukozaminy połączona jest z diosgeniną opracowano w naszym laboratorium. W Zakładzie Chemii Cukrów opracowaliśmy syntezę chlorowodoru O^3 -(2-amino-2-deoksy- β -D-glukopiranozylo)diosgeniny (DsO - β -D-Glc-NH₂ · HCl – związek **6**, tab. 1) oraz kilku jego analogów.

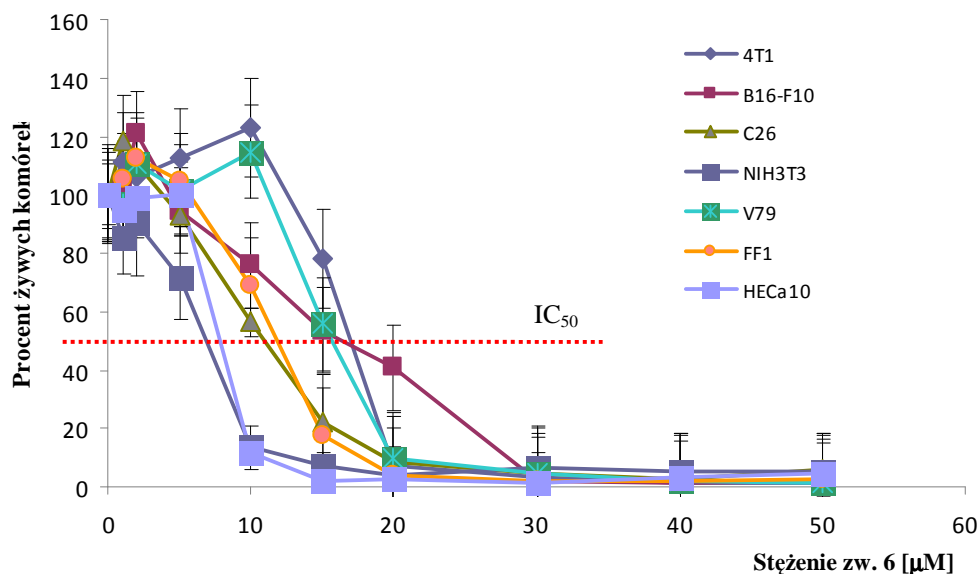


Synteza związku **6** polega na umiejętnym połączeniu odpowiedniej pochodnej D-glukozaminy z diosgeniną a następnie usunięciu osłon z grup –OH oraz z funkcji aminowej. Podstawowym substratem cukrowym w syntezie tych glikozydów jest chlorowodorek D-glukozaminy, z którego w wyniku sekwencji kilku reakcji uzyskuje się związki posiadające odpowiednio zabezpieczoną grupę aminową (osłona tetrachloroftaloilowa lub trichloroetoksykarbonylowa). Takie pochodne w reakcji z TiBr₄, w dichlorometanie przeprowadza się w odpowiednie bromki, tzw. *donory glikozyłu*, których kondensacja z diosgeniną (*akceptor glikozyłu*) prowadzona według zmodyfikowanej metody Koenigsa-Knorra daje właściwy glikozyd diosgenyłu. Po jego oczyszczeniu a następnie usunięciu osłony z funkcji aminowej oraz osłon acetylowych z grup hydroksylowych otrzymuje się tytułowy chlorowodorek (DsO - β -D-Glc-NH₂ · HCl).

Aktywność *in vitro* i skuteczność *in vivo* w stosunku do bakterii Gram-dodatnich saponiny **6** oraz tej saponiny w połączeniu z różnymi antybiotykami, była badana na Univerista Politecnica delle Marche w Ancona (Włochy) a wyniki badań są opublikowane w *J. Med. Microbiology* **60** (2011) 1337-43.

Glikozyd **6** został poddany także badaniom na czterech liniach komórek prawidłowych: mysie fibroblasty – NIH3T3; chomicze fibroblasty – V79; ludzkie fibroblasty – FF-1 i mysie komórki śródbłonkowe – HECa10 oraz na trzech liniach komórek nowotworowych: czerniak mysi – B16-F10; mysia rak sutka – 4T1 i mysia rak jelita grubego – C26. Aktywność przeciwnowotworową badano w Centrum Onkologii, w Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie w Gliwicach, a wyniki obrazujące zależność procentu żywych komórek od stężenia molowego tej saponiny przedstawiono na poniższym wykresie.

Z kolei pochodne chlorowodoru **6** otrzymywane są w wyniku modyfikacji funkcji aminowej.



Wykres przedstawiający zależność procentu żywych komórek od stężenia molowego saponiny **6**

Tabela 1. Aktywność przeciwgrzybowa i przeciwbakteryjna (szczepy referencyjne ATCC i PCM) glikozydów diosgenylu (MIC) [$\mu\text{g/ml}$]

Związek	R	Grzyb			Bakteria G+					Bakteria G-				
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	NH₂-HCl	64	2	0,5	8	16	16	16	16	1000	512	> 1000	> 1000	1000
7	NH(CO)CH₃	256	256	256	> 1000	512	512	> 1000	> 1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000
8	N(CH₃)₂	64	2	2	8	32	64	32	64	1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000
9	N(CH₂CH₃)₂	128	2	1	32	32	16	32	32	1000	512	> 1000	> 1000	1000
10	N(CH₂CH₂CH₃)₂	64	4	4	16	8	16	8	32	1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000
11	N(CH₂CH₂CH₂CH₃)₂	128	8	16	16	8	16	8	8	1000	512	> 1000	> 1000	1000
12	N[CH₂CH₂CH(CH₃)₂]₂	256	16	32	32	4	8	16	32	512	512	> 1000	> 1000	512
13	NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₃	128	128	64	> 1000	> 1000	512	1000	1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000
14	N(CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)₂	128	64	128	64	64	512	128	> 1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000

Uzyskane glikozydy **6 ÷ 14** badano pod kątem ich aktywności biologicznej. I tak, przeprowadzono badania mikrobiologiczne na szczepach referencyjnych niektórych grzybów, z rodziny *Candida* i *Aspergillus* oraz wybranych bakteriach Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Badania prowadzono na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.