

## AUTOREFERAT

**1. Imię i nazwisko:** Barbara Dmochowska

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 1999 r. – stopień doktora nauk chemicznych, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
- 1994 r. – tytuł zawodowy magistra chemii, Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii

**3. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

Od 9 lutego 2001r. do chwili obecnej Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej, adiunkt

**4. Osiągnięcia naukowe wynikające z art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

Za moje osiągnięcie naukowe uważam wyniki badań opisanych w cyklu prac ujętych pod wspólnym tematem: „Tworzenie czwartorzędowych soli *N*-D-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych o potencjalnych właściwościach biologicznych”

**a) autorzy<sup>\*#</sup>, tytuł publikacji, nazwa czasopisma, rok wydania**

**[H-1]** A. Składanowski, P. Stepnowski\*, K. Kleszczyński, **B. Dmochowska**, AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musk, imidazolium ionic liquids and *N*-glucopyranosyl ammonium salts, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005, **19(2)**, 291-296. CI = 20, IF<sub>2005</sub> = 0,905

**[H-2]** L. Pellowska-Januszek, **B. Dmochowska\***, E. Skorupa, J. Chojnacki, W. Wojnowski, A. Wiśniewski, New class of quaternary ammonium salts, derivatives of methyl glucopyranosides, *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 1537-1544. CI = 5, IF<sub>2004</sub> = 1,451

**[H-3]** **B. Dmochowska\***, L. Pellowska-Januszek, E. Skorupa, A. Nowacki, F. Stock, P. Stepnowski, A. Wiśniewski, Synthesis of New Quaternary Ammonium Salts – Derivatives of Phenyl Glucopyranosides, *Pol. J. Chem.* 2006, **80**, 1513-1521. CI = 1, IF<sub>2006</sub> = 0,491

**[H-4]** **B. Dmochowska\***, L. Pellowska-Januszek, Czwartorzędowe sole *N*-D-gliko- i – alditolilopirydyniowe – synteza oraz właściwości, *Przem. Chem.* 2010, **89/11**, 1403-1407. CI = 0, IF<sub>2010</sub> = 0,332

**[H-5]** E. Skorupa, **B. Dmochowska\***, L. Pellowska-Januszek, W. Wojnowski, J. Chojnacki, A. Wiśniewski, Synthesis and structure of selected quaternary *N*-(1,4-anhydro-5-deoxy-2,3-*O*-isopropylidene-D,L-ribitol-5-yl)ammonium salts, *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 2355-2362. CI = 7, IF<sub>2004</sub> = 1,451

**[H-6]** **B. Dmochowska\***, E. Skorupa, L. Pellowska-Januszek, M. Czarkowska, A. Sikorski, A. Wiśniewski, Preparation, single-crystal X-ray diffraction and high-resolution NMR spectroscopic analyses of *N*-[(1,4-anhydro-5-deoxy-2,3-*O*-isopropylidene-D,L-ribitol)-5-yl]trimethylammonium iodide, *Carbohydr. Res.* 2006, **341**, 1916-1921. CI = 4, IF<sub>2006</sub> = 1,703

**[H-7]** **B. Dmochowska\***, E. Skorupa, P. Świtecka, A. Sikorski, I. Łącka, S. Milewski, A. Wiśniewski, Synthesis of some quaternary *N*-(1,4-anhydro-5-deoxy-D,L-ribitol-5-yl)ammonium salts, *J. Carbohydr. Chem.* 2009, **28**, 222–233. CI = 2, IF<sub>2009</sub> = 1,197

[H-8] **B. Dmochowska**, J. Piosik, A. Woziwodzka, K. Sikora, A. Wiśniewski, G. Węgrzyn\*, Mutagenicity of quaternary ammonium salts containing carbohydrate moieties, *J. Hazard. Mater.* 2011, **193**, 272-278. CI = 2, IF<sub>2011</sub> = 3,723

\* autor korespondencyjny

# Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 7.

### Materiały uzupełniające:

[R-1] E. Skorupowa, **B. Dmochowska**, L. Pellowska-Januszek, A. Nowacki, A. Wiśniewski, *Rozdział w książce „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania”*, Badanie wpływu struktury trzeciorzędowych amin alifatycznych na tworzenie się soli *N-D*-glikopiranozyloamoniowych, Poznań, 2001r., ISBN 83-909723-7-9, 385-389.

[R-2] L. Pellowska-Januszek, **B. Dmochowska**, E. Skorupowa, A. Wiśniewski, Proceedings of 4<sup>th</sup> International Conference of PhD Students, Univ. Miskolc, Hungary 2003, Published by Univ. Miskolc, - Innovation and Technology Transfer Centre, Synthesis of New Quaternary Ammonium Salts, Derivatives of Glucosides, ISBN 963 661 593 4, 341-345.

[R-3] A. Wiśniewski, **B. Dmochowska**, L. Pellowska-Januszek, E. Skorupa, *Rozdział w książce „Czwartorzędowe sole amoniowe”*, Sole glikozylo- i glikoamoniowe, Poznań, 2005r., ISBN 83-915-727-5-9, 15-31.

[R-4] **B. Dmochowska**, L. Pellowska-Januszek, E. Skorupa, A. Wiśniewski, *Rozdział w książce „Czwartorzędowe sole amoniowe”*, Tworzenie czwartorzędowych soli *N*-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych, Poznań, 2005r., ISBN 83-915-727-5-9, 215-221.

[R-5] K. Sikora, **B. Dmochowska**, A. Woziwodzka, J. Piosik, G. Węgrzyn, A. Wiśniewski, *Rozdział w książce „Na pograniczu chemii i biologii”*, O bromkach *D*-glikopiranozyd 2-amoniometylu, Poznań, 2011r., ISBN 978-83-232-2368-9, 55-65.

[P-1] **B. Dmochowska**, E. Skorupa, A. Wiśniewski, Sposób otrzymywania tosyłanu 1,3-bis(1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-deoksy-*D,L*-rybitol-5-ilo)imidazol-3-iowego, *PL 210237*.

## Wprowadzenie

### Istniejący stan wiedzy w zakresie tematu badań dotyczących czwartorzędowych soli amoniowych

#### I. Wstęp

Naukowcy na całym świecie od ponad stu lat interesują się czwartorzędowymi solami amoniowymi (QACs, *ang.* Quaternary Ammonium Compounds) [1-3].

Czwartorzędowe sole amoniowe wykazują właściwości związków nieorganicznych (np. bardzo dobrą rozpuszczalność w wodzie) jak i organicznych, a jonowy charakter tych związków decyduje o ich właściwościach hydrofilowych. Popularność tych związków wiąże się z ich szerokim zastosowaniem i łatwością otrzymywania. Czwartorzędowe sole amoniowe są trwałe aż do 150 °C, dobrze rozpuszczalne w wodzie, zazwyczaj nietoksyczne w stężeniu użytkowym, są powierzchniowo czynne, nie mają drażniącego działania na skórę oraz nie mają przykrego zapachu [4]. Wiele z nich ma właściwości grzybobójcze, bakterio-bójcze lub glonobójcze. Istnieją doniesienia o antywirusowym działaniu tych związków, w tym przeciw

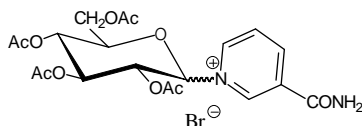
wirusowi HIV. Wykorzystuje się je jako: środki ochrony drewna, środki dezynfekujące, zmiękczone tkaniny, środki antyelektrostatyczne i substancje przeciwzatarciowe. Istnieją badania potwierdzające skuteczność czwartorzędowych soli amoniowych (CSA) jako tzw. wzmacniaczy smaku. Poza tym, niektóre leki na cukrzycę, arytmie serca, nerwice, alergie lub nawet nowotwory są czwartorzędowymi solami amoniowymi. Również w syntezie chemicznej stosuje się CSA jako katalizatory, w reakcji katalizy międzyfazowej [5], oraz w redukcji aldehydów i alkenów, w reakcji Friedla-Craftsa.

Literatura opisująca czwartorzędowe sole amoniowe jest niezwykle obszerna, zdecydowałam się więc wybrać i omówić tylko zagadnienia najistotniejsze z punktu widzenia moich badań: nieliczne opisane przykłady syntezy czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych cukrów oraz ich właściwości.

## II. Cukrowe i alditolowe czwartorzędowe sole amoniowe

Historycznie, pierwszym doniesieniem literaturowym na temat syntezy omawianych związków były prace Fischer'a i Raske'a [6, 7], którzy otrzymali bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukopiranozylo)pirydyniowy przeprowadzając reakcję bromku 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyli z pirydyną wobec katalitycznych ilości fenolu. Zauważyli korelację pomiędzy stężeniem reagentów a ilością powstającego odpowiedniego anomeru. Lemieux oraz Morgan zaproponowali mechanizm tej reakcji [8, 9]. Niskie stężenie bromku per-*O*-acetyloglukopiranozyli w pirydynie determinuje powstawanie trwalszego anomeru  $\beta$  z powodu odwrotnego efektu anomerycznego.

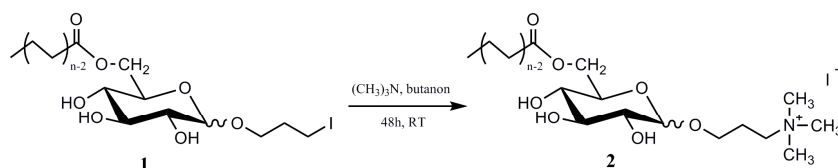
W 1963 roku Lemieux i Lown opublikowali pracę, w której opisali syntezę i strukturę bromków *N*-( $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukopiranozylo)-3-karbamoilopirydiniowych oraz ich per-*O*-acetylowych pochodnych (Rysunek 1), [10].



Rysunek 1

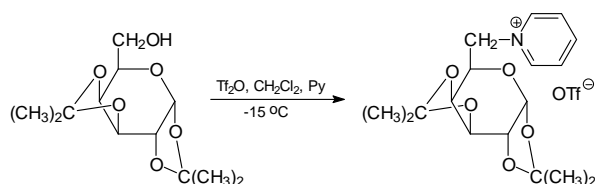
Wiele z publikacji dotyczy *O*-acetylowych pochodnych soli amoniowych, jednak West i Schuerch w swoim komunikacie dotyczącym odwrotnego efektu anomerycznego opisali prawdopodobny mechanizm syntezy bromku *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-benzylo- $\beta$ -D-glukopiranozylo)trietyloamoniowego i bromku *N*-(2,3,4-tri-*O*-benzylo-6-*O*-*p*-metoksybenzoilo- $\beta$ -D-glukopiranozylo)trietyloamoniowego [11].

Kirk i współpracownicy [12] w jednej z prac opisali syntezę związków aktywnych biologicznie. W reakcji Mentschutkina, pomiędzy jodopochodną a trimetyloaminą (Schemat 1), autorzy uzyskali związki wykazujące działanie przeciwbakteryjne (działające zarówno na szczepy bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych) oraz działanie przeciugrybiczne. Substancje te wykazywały także czynność powierzchniową. Analogiczna do przedstawionej na schemacie 1 synteza z chloropochodnej nie przyniosła oczekiwanego efektu w postaci soli, dlatego autorzy w reakcji Finkelstein'a przekształcili chloro- w jodopochodną [13, 14]. Ta z kolei po 48 godz. w temperaturze pokojowej i w roztworze butanonu, w reakcji z trimetyloaminą dała oczekiwaną czwartorzędową sól amoniową. Autorzy uzyskali szereg analogicznych związków o różnej długości łańcucha węglowego kwasu karboksylowego związanego estrowo z grupą C-6-OH pochodnej cukru. Najbardziej efektywną okazała się pochodna **2**, gdzie  $n=12$ .



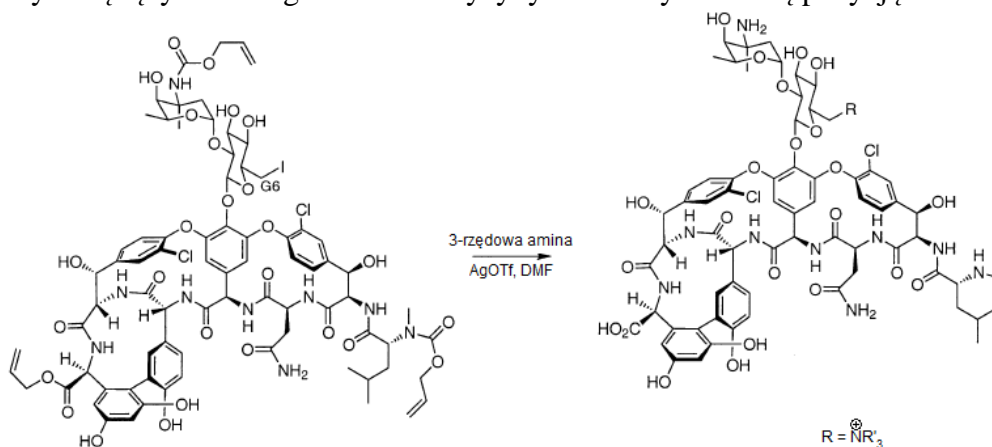
Schemat 1

Ukazała się również praca dotycząca syntezy związków, w których czwartorzędowy, obdarzony ładunkiem dodatnim atom azotu związany jest z terminalnym atomem węgla jednostki cukru. Hall i Miller przeprowadzili reakcję 1,2:3,4-di-*O*-izopropylideno-6-*O*-tosylo- $\alpha$ -D-galaktopiranozy z pirydyną [15, 16]. W tym przypadku, mimo że prowadzono ją w podwyższonej temperaturze, tosylian *N*-[(6-deoksy-1,2:3,4-di-*O*-izopropylideno- $\alpha$ -D-galaktopiranoza)-6-yl]pirydyniowy powstawał z niską 33% wydajnością. W tych samych publikacjach opisano także syntezę triflanu *N*-[(3-deoksy-1,2:5,6-di-*O*-izopropylideno- $\alpha$ -D-allofuranaza)-3-yl]pirydyniowego, który otrzymano z 70% wydajnością (Schemat 2). Autorzy podjęli także próby uzyskania tosyianu *N*-[(3-deoksy-1,2:5,6-di-*O*-izopropylideno- $\beta$ -D-allofuranaza)-3-yl]pirydyniowego oraz tosyianu *N*-[(3-deoksy-1,2:5,6-di-*O*-izopropylideno- $\beta$ -D-glukofuranaza)-3-yl]pirydyniowego, które zakończyły się niepowodzeniem.



Schemat 2

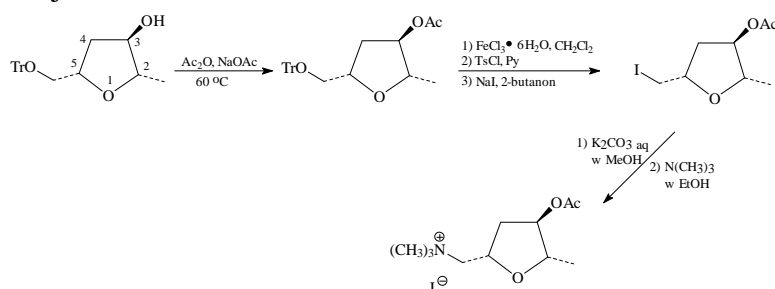
Blizzard ze współpracownikami zsyntezowali czwartorzędowe sole amoniowe, pochodne wankomycyny [17]. Wankomycyna została odkryta ponad 40 lat temu [18] i do tej pory jest antybiotykiem stosowanym w leczeniu licznych infekcji bakteryjnych (wywołanych np. przez gronkowca złocistego), często będąc tzw. lekiem ostatniej szansy. Zauważano, że zwiększenie hydrofilowości wankomycyny poprzez dołączenie do niej odpowiedniego fragmentu zwiększyło jej właściwości przeciwbakteryjne [19, 20], a jedną z bardziej aktywnych okazała się być pochodna posiadająca grupę aminową w pozycji G-6 (Schemat 3). Blizzard [17] i współautorzy opublikowali syntezę m.in. sześciu czwartorzędowych soli amoniowych będących analogami wankomycyny ze zmodyfikowaną pozycją G-6.



Schemat 3

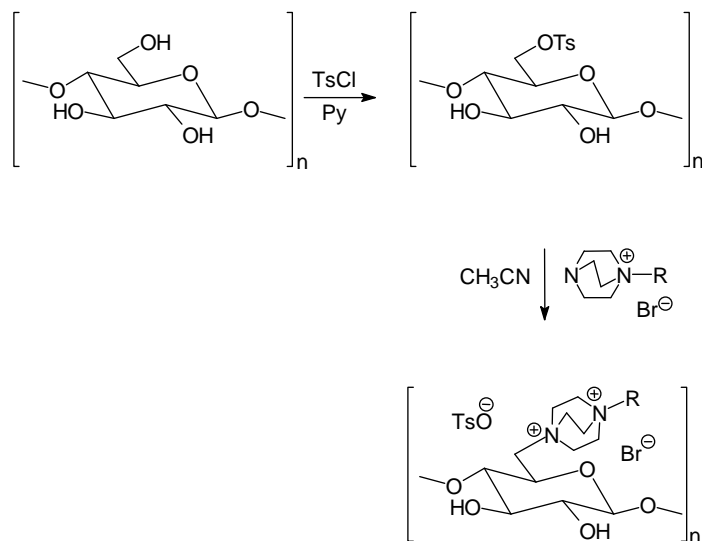
Wszystkie substancje wykazywały aktywność przeciw szczepom *Staphylococcus* i *Enterococcus*.

Badania nad czwartorzędowymi solami trimetyloamoniowymi dotyczą syntezy 3-hydroksymuskaryny tj. tosyłanu *N*-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2,5-anhydro-1,6-dideoksy-heksitol-6-ylo]trimetyloamoniowego z L-ramnopiranozy [21]. 3-Hydroksymuskaryna powstaje w wyniku reakcji 5-*O*-tosylowej pochodnej L-ramnopiranozy z trimetyloaminą w metanolu. Muskaryna i jej pochodne są terapeutykami wykorzystywanymi w chorobie Alzheimera i w chorobach nowotworowych. Kang i współpracownicy opisali chemiczną syntezę (+)-muskaryny z (*S*)-(-)-5-hydroksymetylo-2(5*H*)-furanonu, która w przeciwieństwie do tradycyjnych metod, pozwala na uzyskanie licznych modyfikacji tego związku [22]. Ostatnie etapy syntezy ilustruje Schemat 4:



**Schemat 4**

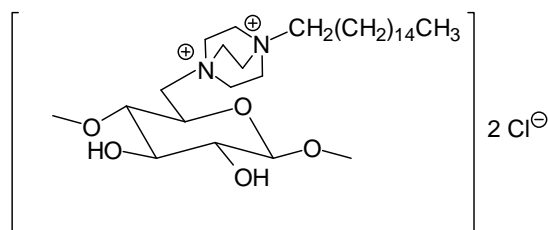
Przykładem reakcji polegających na funkcjonalizowaniu terminalnych atomów węgla w glukopiranozydach metylu, w polisacharydach oraz w mannitolu były syntezы przeprowadzone przez Engel'a i współpracowników [23, 24], z których jedną ilustruje Schemat 5.



**Schemat 5**

Celem autorów było poszukiwanie związków wykazujących właściwości przeciwbakteryjne. W pierwszej kolejności grupy hydroksylowe przy atomach C-6 jednostek cukrowych celulozy uzyskanej z włókna bawełnianego zostały *O*-tosylowane. Następnie terminalne atomy węgla funkcjonalizowano za pomocą trzeciorzędowych amin, uzyskując czwartorzędowe sole amoniowe. Uzyskane sole poddano testom biologicznym na działanie przeciwbakteryjne. Najbardziej bakteriobójczy (zarówno przeciw szczepom Gram-dodatnim jak i Gram-

ujemnym) okazał się związek o łańcuchu 16-węglowym, którego strukturę przedstawia poniższy rysunek.

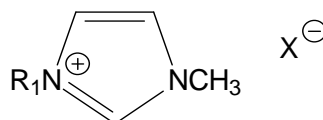


**Rysunek 2**

Liu i Baumann dokonali regioselektywnej modyfikacji C-6 kilku jednostek monosacharydowych celulozy [25]. Pierwszym etapem syntezy było podstawienie grupy hydroksylowej przy C-6 grupami *O*-tosylowymi. Autorzy określili stopień podstawienia posługując się tzw. metodą trójkąta. Następnie otrzymany związek ogrzewali z aminami, w tym z pirydyną. „6-*O*-Tosylcelulozę” rozpuścili w DMSO i do uzyskanego roztworu dodali pirydynę, a następnie ogrzewali w temperaturze 100 °C przez 24 godz. Otrzymali odpowiednią sól pirydyniową pochodną celulozy z wydajnością 84% w stosunku do oszacowanej poprzednio ilości grup *O*-tosylowych.

W 1983 Preston [26] wykazał wpływ liczby atomów węgla w CSA na wzrost aktywności twierdząc, że najbardziej efektywne są związki zawierające 22-24 atomy węgla. Przeprowadzono badania nad czwartorzędowymi solami amoniowymi pochodnych imidazolu [27] z podstawnikami alkilowymi (Rysunek 3) o różnej długości łańcucha węglowego.

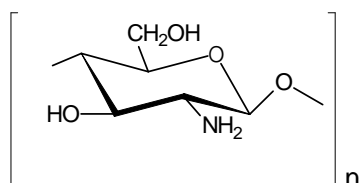
$R_1$  – podstawnik alkilowy  
X – Cl lub Br



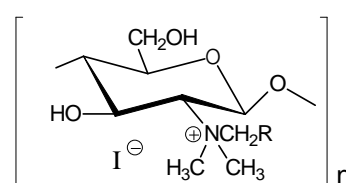
**Rysunek 3**

Okazało się, że największą aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą charakteryzują się związki o łańcuchu zawierającym od dwunastu do szesnastu atomów węgla.

W literaturze istnieje wiele doniesień, świadczących o wzroście aktywności danego związku, po przeprowadzeniu w czwartorzędową sól amoniową. Najlepiej o tym świadczą mogą intensywne badania prowadzone w celu otrzymania pochodnych chitosanu (Rysunek 4) – deacetylowanej chityny, którego aktywność jest tym większy, im wyższy stopień deacetylacji. Wykazuje on wysoką biodegradowalność, charakteryzuje się właściwościami przeciwbakteryjnymi, ponadto ułatwia gojenie ran, działa nawet przeciwnowotworowo.



**Rysunek 4**

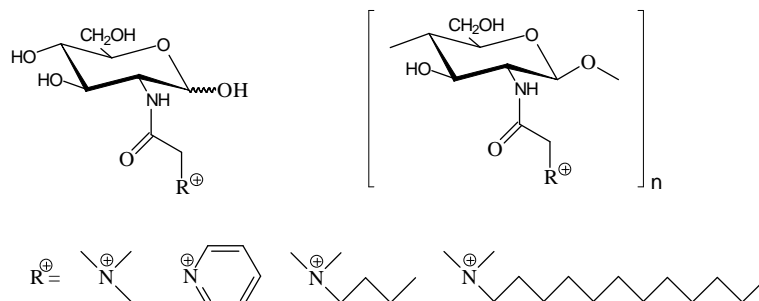


**Rysunek 5**

Prowadzone obecnie badania pokazują, że przekształcanie cząsteczki chitosanu w czwartorzędową sól (Rysunek 5) zwiększa jego właściwości przeciwbakteryjne, ponadto polepsza rozpuszczalność, co ułatwia przenikanie substancji do komórki [28]. Przypuszczalny

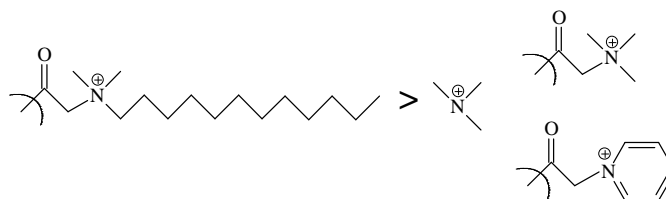


mechanizm oddziaływania z powierzchnią komórki mikroorganizmu polega na interakcji grupy amoniowej obdarzonej ładunkiem dodatnim z ujemnie naładowaną powierzchnią komórki mikroorganizmu. Rúnarsson i współpracownicy [29] przebadali czwartorzędowe sole amoniowe pochodne chitosanu i D-glukozaminy.

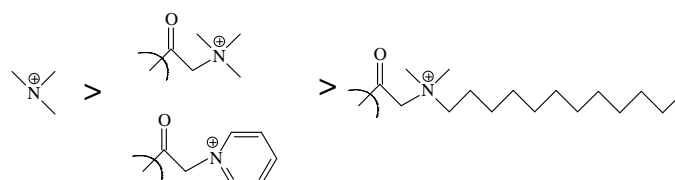


**Rysunek 6**

Dla wszystkich związków wyznaczono MIC (minimalne stężenie hamujące) i MLC (minimalne stężenie zabijające) wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Na podstawie wyznaczonych MIC i MLC uszeregowano aktywność przeciwbakteryjną czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych glukozaminy:



oraz pochodnych chitosanu:



Na podkreślenie zasługuje przetestowana aktywność biologiczna podwójnych soli gemini. Obecnie zaobserwować można intensywny wzrost zainteresowania badaniami nad solami podwójnymi. Okazuje się, że istnieje matematyczna zależność pozwalająca określić aktywność biologiczną soli na podstawie znajomości jej aktywności powierzchniowej, na którą ma wpływ długość łącznika (*spacera*). Ponadto udowodniono, że aktywność grzybobójcza wzrasta liniowo wraz ze spadkiem CMC (stężenie, powyżej którego cząsteczki surfaktantu agregują tworząc micelle) [30].

Surfaktanty oparte na czwartorzędowych solach amoniowych gemini (nie cukrowych) bardzo łatwo łączą się z DNA. Wydajność procesów z użyciem surfaktantów gemini znacznie przewyższa poziom jaki można uzyskać z użyciem monomerycznych odpowiedników. Efektywnie obniżają napięcie powierzchniowe, wiele z nich ma właściwości przeciwbakteryjne skierowane zarówno przeciw bakteriom Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym, mają zdolności grzybobójcze jak i wiele z nich jest biodegradowalnych. Obecnie prowadzone są badania z surfaktantami gemini zawierającymi „cukrową główkę” (D-glukozę lub D-mannozę) oraz ich zastosowaniem jako niewirusowych nośników genów. Pierwsze

wyniki okazały się na tyle obiecujące, że obecnie prowadzone są badania nad ich zastosowaniem *in vivo* [31].

Powyższe, interesujące, wyniki oraz własne wyniki dotyczące syntez soli *N*-(D-glikopiranozylo)amoniowych, potencjalna aktywność przeciwbakteryjna i przeciwwirusowa skłoniła mnie do kontynuowania tej tematyki.

## Cel prowadzonych badań

Czwartorzędowe sole amoniowe należą do grupy związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, z których najważniejszymi są aktywność przeciwwirusowa, przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza. W związku z tym znajdują one praktyczne zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu, medycyny, rolnictwa i życia codziennego. Jednak dynamiczny rozwój tych dziedzin, a także wciąż nowe mutacje wirusów, bakterii i grzybów skłaniają do poszukiwania nowych, aktywnych substancji. Dodatkowo, zagrożenie ze strony pojawiających się mikroorganizmów opornych na stosowane dotychczas antybiotyki uczyniło koniecznym syntezowanie nowych i skuteczniejszych leków. Większość dostępnych czwartorzędowych soli amoniowych ma wady ograniczające ich zastosowanie. Wykazują małą kompatybilność z innymi środkami, np. anionowe surfaktanty oraz mydła blokują działanie czwartorzędowych soli poprzez tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów [32]. Drugą wadą jest problem z biodegradowalnością. Utworzenie czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych cukrów i alditoli pozwala na wyeliminowanie tego problemu.

W przeciwieństwie do obszernej literatury dotyczącej *N*-alkilowych i *N*-arylowych soli pirydyniowych, niewiele można znaleźć publikacji na temat analogów *N*-glikozyloamoniowych. Do tej pory nie prowadzono gruntowych i na szeroką skalę prac związanych z otrzymywaniem czwartorzędowych soli *N*-gliko- i alditoliloamoniowych, badaniem ich budowy oraz właściwości chemicznych i biologicznych.

Celem moich badań było poszukiwanie korelacji pomiędzy strukturą podstawników przy czwartorzędowym atomie azotu a aktywnością biologiczną syntezowanych związków. W poszukiwaniu nowych związków o potencjalnej aktywności biologicznej zsyntezowałam czwartorzędowe sole *N*-D-glikoamoniowe i alditoliloamoniowe, w których atom azotu związany jest z terminalnym atomem węgla w jednostce cukru bądź alditolu. Interesowała mnie również możliwość podstawienia nukleofilowego przy atomie węgla C-6 w heksopiranozach, przy C-5 w pentofuranozach oraz przy C-5 w 1,4-anhydropentitolach. Wybór cukrów i anhydroalditoli oraz zestawu amin do tworzenia czwartorzędowych soli



amoniowych podyktowany został zarówno doniesieniami literaturowymi jak i własnymi doświadczeniami.

Realizacja tak sformułowanego zadania stanowi podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, mało szkodliwych człowiekowi i środowisku, specyfików.

Poniżej przedstawiam krótkie streszczenia prac poświęconych syntezie, charakterystyce, badaniom biologicznym i rentgenostrukturalnym czwartorzędowych soli *N*-D-glikozylo-, *N*-D-gliko- i alditoliloamoniowych.

**[H-1]** A. Składanowski, P. Stepnowski, K. Kleszczyński, **B. Dmochowska**, AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musk, imidazolium ionic liquids and *N*-glucopyranosyl ammonium salts, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2005, **19(2)**, 291-296.

W celu poszerzenia uzyskanych wyników w trakcie studium doktoranckiego, przebadalam reakcje tworzenia soli *N*-D-glukopiranozyloamoniowych z trzeciorzędowych amin alifatycznych. Wśród produktów reakcji bromku 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyli z trimetyloaminą zidentyfikowałam oprócz bromku *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyli)trimetyloamoniowego (wcześniej zsyntezowanego przez Panią dr Eugenię Skorupę, z naszego Zakładu) także 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo-1,5-anhydro-D-*arabino*-heks-1-enitol. Per-*O*-acetylo-1,5-anhydro-D-*arabino*-heks-1-enitol jest prawdopodobnie wynikiem reakcji konkurencyjnej polegającej na ataku trimetyloaminy, jako silnej zasady, na atom wodoru przy węglu C-2 bromku 2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyli prowadzącej do reakcji eliminacji E2 z utworzeniem bromowodoru (wiązanego przez nadmiar aminy). Bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyli)trimetyloamoniowy poddałam reakcji z metanolanem sodu w metanolu uzyskując głównie produkt cyklizacji - 1,2-anhydro-D-glukopiranozę (89%) oraz produkty substytucji, tj.  $\alpha$ -D-glukopiranozyd metylu (7%) i  $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu (3%). W pracy zaprezentowaliśmy wyniki badań biologicznych dla szeregu związków, które podzielono na 3 grupy: pierwsza grupa to czwartorzędowe sole *N*-D-glukopiranozyloamoniowe: bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyli)trimetyloamoniowy i bromek *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyli)pirydyniowy, druga to ciecze jonowe a grupa trzecia to syntetyczne piżma. Do badań wykorzystano preparat deaminazy AMP izolowanej z mięśni szkieletowych szczura rasy Wistar. Jest to enzym hydrolizujący AMP (adenozyno 5'-monofosforan) do IMP (inozyno 5'-

monofosforan) i amoniaku, biorący udział w cyklu nukleotydów purynowych i występujący powszechnie w tkankach kręgowców. Przy pomocy testu określono stopień hamowania aktywności enzymu przez zestaw badanych substancji, rodzaj inhibicji oraz zależność struktura-aktywność. Wykonaliśmy badania inhibitorowe enzymu określając stałe inhibitorowe  $I_{50\%}$  opisujące stężenie związku hamującego aktywność enzymu w 50%. Najsilniej hamującymi związkami okazała się grupa syntetycznych piżm, a słabszymi czwartorzędowe sole *N*-D-glikopiranozyloamoniowe i ciecze jonowe. Do określenia rodzaju inhibicji badanych związków wykorzystano zależności Dixon'a, które wskazywały na niekompetycyjny rodzaj inhibicji deaminazy AMP przez wszystkie z badanych związków. Pomimo podobnej struktury bromki *N*-D-glukopiranozyloamoniowe różnią się stałymi inhibitorowymi:  $I_{50\%}$  0.05 mM dla soli *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozylo)pirydyniowej, podczas gdy sól *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozylo)-trimetyloamoniowa hamuje aktywność enzymu 10-ciokrotnie razy słabiej.

Badania zostały wykonane we współpracy z Zakładem Enzymologii Molekularnej, na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed. Wyniki badań zostały również przedstawione w artykule książki „Czwartorzędowe sole amoniowe i obszary ich zastosowania” [R-1].

[H-2] L. Pellowska-Januszek, **B. Dmochowska**, E. Skorupa, J. Chojnacki, W. Wojnowski, A. Wiśniewski, New class of quaternary ammonium salts, derivatives of methyl glucopyranosides, *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 1537-1544.

Przedmiotem moich badań przedstawionych w tej pracy były tosyłany *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\alpha$ - i  $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowe. Syntezy prowadziłam w oparciu o dwa substraty różniące się konfiguracją podstawnika przy anomerycznym atomie węgla: tzn. 6-*O*-tosylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd metylu i 6-*O*-tosylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu. Przebadałam reakcje powyższych substratów z aminami alifatycznymi – trimetyloaminą w etanolu, trietyloaminą oraz z dwiema aminami aromatycznymi – pirydyną i 2-metylopirydyną. W wyniku zastosowanych klasycznych warunków reakcji czwartorzędowania (analogicznych jak dla soli *N*-D-glukopiranozyloamoniowych: ilości molowe substratów, temperatura pokojowa) nie uzyskałam oczekiwanych produktów. 6-*O*-Tosylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd metylu i 6-*O*-tosylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu reaguje z trimetyloaminą wyłącznie wtedy, gdy reakcje prowadzone są w łaźni ultradźwiękowej. Analogiczna reakcja z trietyloaminą nie zachodziła, nawet w minimalnym stopniu. Z kolei, z aminami aromatycznymi mimo zastosowania łaźni ultradźwiękowej wydajności są bardzo

małe, rzędu 20%. Stąd, przeprowadziłam syntezę powyższych soli w zakręcanych, gwintowanych ampułkach umieszczonych w bloczku grzejnym o temperaturze 70 °C. W tych warunkach uzyskałam lepsze wydajności dla anomeru  $\beta$  niż  $\alpha$  6-*O*-tosylo-D-glukopiranozydu metylu. Analizy widm  $^1\text{H}$  NMR potwierdzają przypisaną konformację krzesłową  $^4\text{C}_1$  tych związków w roztworze. Dla tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego przeprowadzono badania krystalograficzne. Pierścień piranozowy tej soli przyjmuje niemal idealną konformację krzesłową  $^4\text{C}_1$  (identyczna z występującą w roztworze), co dowodzi, że ugrupowanie amoniowe znajdujące się przy terminalnym atomie węgla nie wpływa na konformację pierścienia cukru.

Badania prowadziłam w ramach projektu BW/8000-5-0223-3. Wyniki syntez 6-*O*-tosylo- $\alpha$ -D-glukopiranozydu metylu i 6-*O*-tosylo- $\beta$ -D-glukopiranozydu metylu z trzeciorzędowymi aminami przedstawiono również w pracy [H-4] oraz w artykule książki „Czwartorzędowe sole amoniowe” [R-3].

Kolejne zadanie podyktowane było doniesieniami literaturowymi o aktywności biologicznej czwartorzędowych jodków amoniowych, stąd poddałam reakcji 2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-6-jodo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd metylu z aminami trzeciorzędowymi (trimetyloaminą w etanolu oraz pirydyną). Również w tym przypadku reakcja z trimetyloaminą była możliwa jedynie po zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej. Reakcje otrzymywania jodków *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\alpha$ -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych zachodziły trudniej niż analogiczne reakcje otrzymywania tosyłanów. Anion jodkowy nie jest tak dobrą grupą odchodzącą jak anion tosyłanowy stąd niższe wydajności reakcji czwartorzędowania. Wyniki powyższych badań opisałam w recenzowanych materiałach pokonferencyjnych [R-2] oraz w artykule książki „Czwartorzędowe sole amoniowe” [R-3].

**[H-3] B. Dmochowska**, L. Pellowska-Januszek, E. Skorupa, A. Nowacki, F. Stock, P. Stepnowski, A. Wiśniewski, Synthesis of New Quaternary Ammonium Salts – Derivatives of Phenyl Glucopyranosides, *Pol. J. Chem.* 2006, **80**, 1513-1521.

W celu przebadania wpływu podstawnika (OMe, OPh) przy anomerycznym atomie węgla na szybkość tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych na terminalnym atomie węgla C-6 D-glukopiranozydów, reakcjom czwartorzędowania poddałam 2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-*O*-tosylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd fenylu. Ponieważ reakcje 6-*O*-tosylo- $\beta$ -D-glukopiranozydu metylu z trzeciorzędowymi aminami zachodziły z większymi wydajnościami niż dla 6-*O*-tosylo- $\alpha$ -D-glukopiranozydu metylu do badań użyłam jedynie anomeru  $\beta$  2,3,4-tri-*O*-acetylo-

6-*O*-tosylo-D-glukopiranozydu fenylu oraz dwóch trzeciorzędowych amin alifatycznych (trimetyloamina w etanolu i trietyloamina) i trzech amin aromatycznych (4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna, 2-metylopirydyna oraz pirydyna). Wykazałam, że tosyłan *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd fenylu)-6-ylo]trimetyloamoniowy tworzy się z dużo większą wydajnością niż tosyłan *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowy. Natomiast w wyniku reakcji 2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-*O*-tosylo-β-D-glukopiranozyd fenylu z trietyloaminą otrzymałam tosyłan *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd fenylu)-6-ylo]trietyloamoniowy z 30% wydajnością. W analogicznej reakcji dla pochodnej β-D-glukopiranozydu metylu nie obserwowałam nawet śladowych ilości tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trietyloamoniowego. Z kolei, w wyniku reakcji 2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-*O*-tosylo-β-D-glukopiranozydu fenylu z aminami aromatycznymi otrzymałam zaprojektowane sole. Wydajność reakcji tworzenia soli *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd fenylu)-6-ylo]amoniowych malała w szeregu: pirydyna (48%), 2-metylopirydyna (25%), 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyna (18%). Spadek wydajności tworzenia soli 2-metylopirydyniowej, w stosunku do soli pirydyniowej spowodowany był obecnością grupy metylowej w pozycji 2, co z pewnością utrudniło atak nukleofilowy atomu azotu na atom węgla C-6 *O*-tosylowej pochodnej cukru.

Wstępne badania teoretyczne w fazie gazowej (dotyczące wpływu podstawnika, OMe/OPh, przy anomerycznym atomie węgla na szybkość tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych na terminalnym atomie węgla C-6 D-glukopiranozydów) wykluczyły przypuszczenia, że zaobserwowane różnice w wydajnościach spowodowane są efektami sterycznymi. Dostęp do centrum reakcji jest podobnie łatwy we wszystkich przypadkach, niezależnie od struktury aglikonu (OMe czy OPh). Taki stan może być spowodowany czynnikami elektronowymi, co będzie przedmiotem naszych dalszych badań.

We współpracy z Centre for Environmental Research and Technology w Bremen przeprowadzone zostały badania cytotoksyczności tosyłanów *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-α- i β-D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]amoniowych oraz tosyłanów *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy-β-D-glukopiranozyd fenylu)-6-ylo]amoniowych. Została ona wyznaczona w oparciu o test WST-1 polegający na określeniu przeżywalności szczurzych komórek białaczkowych (linia IPC-81). Celem tego testu było zbadanie wpływu poszczególnych związków na układ krwionośny. Cytotoksyczność związków została wyrażona jako procent

przeżywalności komórek poddanych testowi, w stosunku do próby kontrolnej. Wyniki doświadczeń analizowano logarymicznym modelem statystycznym (model probitowy) przedstawiając je w postaci krzywych dawka–efekt, odzwierciedlających zależność przeżywalności komórek od logarytmu dziesiętnego ze stężeń testowanych związków. Wartości stężeń skutecznego  $EC_{50}$  zostały odczytane z otrzymanych krzywych dawka–efekt.

Badane związki nie wykazywały w ogóle, bądź wykazywały bardzo niską, cytotoksyczność wobec komórek IPC-81. Dla dwóch z przebadanych związków, tj. tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\alpha$ -*D*-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego oraz tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\alpha$ -*D*-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]pirydyniowego, określono dawki skuteczne. W przypadku pozostałych substancji nie zauważono znaczącej inhibicji przeżywalności komórek, w badanym zakresie stężeń. Wszystkie badane związki wykazały niską toksyczność ( $EC_{50}$  wysokie, powyżej 1000  $\mu$ M) w stosunku do komórek białaczkowych. Jednak nie udało się znaleźć korelacji między budową badanych soli a ich cytotoksycznością.

Wyniki syntez 6-*O*-tosylo- $\beta$ -*D*-glukopiranozyd fenylu z trzeciorzędowymi aminami oraz wyniki badań biologicznych przedstawiono również w pracy [H-4] oraz w artykule książki „Czwartorzędowe sole amoniowe” [R-3].

**[H-4] B. Dmochowska, L. Pellowa-Januszek, Czwartorzędowe sole *N*-*D*-gliko- i – alditolilopirydyniowe – synteza oraz właściwości, *Przem. Chem.* 2010, **89/11**, 1403-1407.**

W tej pracy opisałam m.in. syntezę czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych  $\beta$ -*D*-rybofuranozydu metylu. Do syntezy użyłam szerokiej gamy amin: dwóch amin alifatycznych: trimetyloaminę i trietyloaminę oraz dziewięciu amin aromatycznych: 2,2'-bipirydyli, 4,4'-bipirydyli, chinolinę, 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydynę, izochinolinę, 3-karbamoilopirydynę, imidazol, 2-metylopirydynę, pirydynę. Wydajności reakcji tworzenia tosyłanów *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno- $\beta$ -*D*-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]amoniowych wynosiły od 28% do 78%. W reakcji 2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo- $\beta$ -*D*-rybofuranozydu metylu z izochinoliną uzyskałam oczekiwaną sól z dobrą wydajnością (72%), natomiast z chinoliną powstawały jedynie śladowe ilości. W przypadku chinoliny atak nukleofilowy wolnej pary elektronowej atomu azotu na atom węgla C-5 pochodnej 5-*O*-tosylowej rybofuranozydu metylu był utrudniony z powodu podobnej zawady przestrzennej jak w przypadku 2-metylopirydyny i w związku z tym czwartorzędowa sól amoniowa tworzyła się w niewielkim stopniu. Z kolei, reakcję 2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo- $\beta$ -*D*-rybofuranozydu

metylu z 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydyną przeprowadziłam w acetonitrylu w temperaturze 70 °C oraz w 100 °C bez rozpuszczalnika. Wykazałam, że w warunkach stapiania substratów czas reakcji ulega znacznemu skróceniu (700 godz. → 50 godz.) i produkt tworzy się z lepszą wydajnością (30% → 70%). Reakcje z 3-karbamoilopirydyną, imidazolem oraz 2,2'-bipirydylem nie powiodły się. Tosylan *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowy został poddany badaniom krystalograficznym. Pierścień furanozowy przyjmuje w kryształach konformację E<sup>1</sup> (P=314.5(3)<sup>o</sup>), natomiast pierścień dioksolanowy przyjmuje konformację <sup>o</sup>T<sub>1</sub> (P=100.3(3)<sup>o</sup>), (nieopublikowane dane krystalograficzne zdeponowałam w bazie krystalograficznej, Cambridge Crystallographic Data Centre, o numerze CCDC 253951).

Przebadałam analogiczne reakcje zmieniając grupę odchodzącą z *O*-tosylowej na *O*-mesylową i na *O*-triflilową. Reakcje 5-*O*-mesylowej pochodnej rybofuranozydu metylu z trzeciorzędowymi aminami przebiegały z niższymi wydajnościami. Z kolei, wysoka reaktywność bezwodnika triflilowego skłoniła mnie do prowadzenia reakcji 5-*O*-triflilowania w temperaturze - 50 °C. Bez wyodrębniania substratowego 2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-triflilo-β-D-rybofuranozydu metylu roztwór ogrzałam do temperatury pokojowej uzyskując triflan *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]pirydyniowy niemal ze 100% wydajnością.

Zebrany materiał pozwala mi ocenić szybkość czwartorzędowania pochodnych β-D-rybofuranozydu metylu w zależności od rodzaju użytej aminy i typu grupy odchodzącej. Powyższe wyniki przedstawiłam również w artykule książki „Czwartorzędowe sole amoniowe” [R-3].

**[H-5]** E. Skorupa, **B. Dmochowska**, L. Pellowska-Januszek, W. Wojnowski, J. Chojnacki, A. Wiśniewski, Synthesis and structure of selected quaternary *N*-(1,4-anhydro-5-deoxy-2,3-*O*-isopropylidene-D,L-ribitol-5-yl)ammonium salts, *Carbohydr. Res.* 2004, **339**, 2355-2362.

Doniesienia literaturowe, dotyczące muskaryny i jej analogów, oraz wykorzystanie ich w leczeniu choroby Alzheimera oraz w chemioterapii, były bodźcem do syntezy czwartorzędowych soli amoniowych, posiadających anhydroalditol (podobieństwo struktury do muskaryny) jako jeden z podstawników przy atomie azotu. Kolejnym celem było sprawdzenie jaki wpływ ma brak podstawnika przy atomie węgla C-1, z czym mamy do czynienia w cząsteczce anhydroalditolu, na reakcję czwartorzędowania oraz na aktywność przeciwgrzybiczą w porównaniu z wyżej omówionym β-D-rybofuranozydem metylu.



Jako modelowego związku użyłam *meso* rybitolu, który otrzymałam w wyniku redukcji D-rybozy. Tak otrzymany związek poddałam reakcji cyklizacji 2 M kwasem solnym otrzymując 1,4-anhydro-D,L-rybitol. Aby zsyntezować czwartorzędową sól amoniową zawierającą wiązanie *N*-C-5 zablokowałam wycinalne grupy alkoholowe 1,4-anhydro-D,L-rybitolu osłoną *O*-izopropylidenową a grupę hydroksylową przy C-5 estryfikowałam chlorkiem *p*-toluenosulfonylu (TsCl) uzyskując 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitol, który był substratem w reakcji czwartorzędowania. Do powyższej reakcji użyłam dwóch amin alifatycznych oraz sześciu amin aromatycznych. Wydajności otrzymanych tosylianów *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)amoniowych były znacząco wyższe w porównaniu z wydajnościami odpowiednich tosylianów *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]amoniowych. Brak podstawnika przy pierwszym atomie węgla C-1 zdecydowanie ułatwia reakcję czwartorzędowania przy piątym atomie węgla C-5 cząsteczki 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu. Ciekawe wyniki uzyskałam w reakcji czwartorzędowania imidazolem. W reakcji 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu z imidazolem w acetonitrylu w temperaturze 70 °C uzyskałam tosylian *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)imidazoliowy, natomiast bez rozpuszczalnika i w temperaturze 115 °C otrzymałam z wysoką 90% wydajnością sól-związek zawierający dwie reszty anhydrorybitolu, tj. tosylian *N*<sup>1</sup>,*N*<sup>3</sup>-bis(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)imidazoliowy. Dla tosylianu *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)trimetyloamoniowego przeprowadzono badania krystalograficzne. Analiza rentgenostrukturalna potwierdza, że związek tworzy bicykliczną strukturę, składającą się z zespolonego pierścienia tetrahydrofuranowego i pięcioczłonowego pierścienia dioksolanowego. Pierścień tetrahydrofuranowy przyjmuje w kryształach konformację E<sub>o</sub> (P=268.3(5)<sup>o</sup>), natomiast pierścień dioksolanowy występuje w konformacji E<sup>1</sup> (P=313.0(6)<sup>o</sup>).

Zsyntezowane związki poddane zostały badaniom cytotoksyczności wobec komórek białaczkowych linii IPC-81. Dodatkowo poddano je badaniom pod kątem aktywności przeciwwgrzybiczej. Badane związki nie wykazywały powyższej aktywności.

Wyniki syntez czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych 1,4-anhydro-D,L-rybitolu opisałam również w patencie [P-1] oraz w artykułach książki „Czwartorzędowe sole amoniowe” [R-3], [R-4].

**[H-6] B. Dmochowska**, E. Skorupa, L. Pellowska-Januszek, M. Czarkowska, A. Sikorski, A. Wiśniewski, Preparation, single-crystal X-ray diffraction and high-resolution NMR spectroscopic analyses of *N*-[(1,4-anhydro-5-deoxy-2,3-*O*-isopropylideno-D,L-ribitol)-5-yl]trimethylammonium iodide, *Carbohydr. Res.* 2006, **341**, 1916-1921.

W tej pracy przedstawiłam syntezę oraz strukturę krystalograficzną jodku *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowego. Mając do dyspozycji 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol poddałam go działaniu jodu, trifenylofosfiny i imidazolu, tworzących w toluenie układ dwufazowy, uzyskując 1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-5-jodo-D,L-rybitol, który następnie przeprowadziłam w jodek *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowy z 72% wydajnością, niższą niż w analogicznym tosylanie *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowym (100%). Dla jodku *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)trimetyloamoniowego przeprowadzono badania krystalograficzne celem sprawdzenia czy zmiana anionu (OTs→I) w obecności tego samego kationu wpływa na konformację pierścienia tetrahydrofuranowego. Analiza rentgenostrukturalna wykazała, że pierścień tetrahydrofuranowy przyjmuje w kryształach konformację  ${}^{\circ}T_1$  ( $P=108(1)^{\circ}$ ), natomiast pierścień dioksolanowy występuje w konformacji  $E_o$  ( $P=272(1)^{\circ}$ ). Zatem, zamiana OTs→I powoduje zmianę konformacji pierścienia tetrahydrofuranowego.

**[H-7] B. Dmochowska**, E. Skorupa, P. Świtecka, A. Sikorski, I. Łącka, S. Milewski, A. Winiewski, Synthesis of some quaternary *N*-(1,4-anhydro-5-deoxy-D,L-ribitol-5-yl)ammonium salts, *J. Carbohydr. Chem.* 2009, **28**, 222–233.

Jedną z przyczyn braku aktywności przeciwgrzybiczej czwartorzędowych soli *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)amoniowych może być obecność osłony *O*-izopropylidenowej. Usunięcie osłony *O*-izopropylidenowej powoduje większe podobieństwo w budowie do muskaryny, która nie posiada grup ochronnych. Korzystając z informacji literaturowych, dotyczących usuwania osłony *O*-izopropylidenowej w różnych klasach związków wybrałam metodę z kwasem trifluorooctowym. Opracowania warunków usuwania osłony *O*-izopropylidenowej wykonałam zarówno dla pochodnej *O*-tosylowej jak i dla uzyskanych soli *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)amoniowych. Łatwiejsze usuwanie osłony *O*-izopropylidenowej z pochodnej 5-*O*-tosylowej 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitolu (20 minut) niż w przypadku tosylanu *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-D,L-rybitol-5-ilo)amoniowego (90 minut) może wynikać z

efektu indukcyjnego podstawnika amoniowego obdarzonego pełnym ładunkiem dodatnim. Powyższa obserwacja skłania do planowania syntez docelowych związków w taki sposób, aby tworzenie soli było ostatnim etapem.

Dla dwóch związków: 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu oraz 1,4-anhydro-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu przeprowadzono badania krystalograficzne. Wyniki badań dyfraktometrycznych potwierdzają, że 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitol tworzy bicykliczną strukturę, składającą się z zespolonego pierścienia tetrahydrofuranowego i pięcioczłonowego pierścienia dioksolanowego. Pierścień tetrahydrofuranowy 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu przyjmuje w kryształach konformację  $E^o$  ( $P=88.1(4)^o$ ), natomiast pierścień dioksolanowy występuje w konformacji:  ${}^4T_o$  ( $P=248.0(8)^o$  – pierścień A) i  ${}^2T_3$  ( $P=179.9(11)^o$  – pierścień B). Pierścień tetrahydrofuranowy 1,4-anhydro-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu występuje w konformacji  $E_3$  ( $P=204.8(1)^o$ ).

Zsyntezowane związki nie wykazywały cytotoksyczności wobec komórek IPC-81. Dodatkowo poddano je badaniom pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej. Badania aktywności przeciwgrzybiczej zostały wykonane we współpracy z Katedrą Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej. Użyto standardowego szczepu *Candida albicans* pochodzącego z kolekcji Katedry Technologii Leków i Biochemii PG oraz szczepów klinicznych *Candida glabrata* i *Candida tropicalis*. Wartości MIC określone były metodą podwójnych seryjnych rozcieńczeń w 96 studzienkowych mikroplótkach (Medlab, Sigma), o podłożu YNBG odpowiednim dla każdego ze szczepów lub RPMI-1640. MIC definiowano jako najniższe stężenie związku powodujące przynajmniej 80% zahamowanie wzrostu. Oceny dokonywano przy pomocy czytnika mikroplótek (Labsystems, Multiscan Bichromatic). Jako MIC w odczycie automatycznym przyjmowano najniższe stężenie związku powodujące zahamowanie wzrostu w stopniu takim, że  $OD_{660}$  w odpowiedniej studzience było niższe lub równe 20%  $OD_{660}$  w studzience kontrolnej. W badaniach aktywności przeciwgrzybowej wykorzystano dwa rodzaje podłoża: RPMI-1640 i YNBG z dodatkiem D-glukozy i siarczanu(VI) amonu jako źródła azotu. Oznaczane związki były badane w 10 kolejnych seryjnych (podwójnych) rozcieńczeniach, w zakresie od 5000  $\mu\text{g}$  do 1 mg. Badane związki nie wykazywały aktywności przeciwgrzybiczej.

**[H-8] B. Dmochowska, J. Piosik, A. Woziwodzka, K. Sikora, A. Wiśniewski, G. Węgrzyn, Mutagenicity of quaternary ammonium salts containing carbohydrate moieties, *J. Hazard. Mater.* 2011, **193**, 272-278.**

Przedstawione w powyższych pracach czwartorzędowe sole *N*-D-glikozyloamoniowe i alditoliloamoniowe nie wykazywały lub wykazywały nikłą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą w badanych testach biologicznych. Stąd, postanowiłam zsyntezować czwartorzędowe sole amoniowe, w których atom azotu odsunięty jest od pierścienia cukrowego o dwa atomy węgla, tj. bromki glikopiranozyd 2-amonioetylu o konfiguracji D-galakto, D-gluko i D-manno. W pierwszym etapie syntezy, głównymi produktami są 1,2-*trans* glikozydy, co determinuje powstawanie w przewodzie anomeru  $\beta$  w przypadku D-galaktozy oraz D-glukozy, natomiast w przypadku D-mannozy anomeru  $\alpha$ . Zastosowanie kwasu Lewisa ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) jako aktywatora pozwoliło mi uzyskać odpowiednie, krystaliczne produkty o konfiguracji:  $\beta$ -D-galakto oraz  $\beta$ -D-gluko, tj. 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd 2-bromoetylu oraz 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd 2-bromoetylu. Niestety, metoda ta pozwoliła otrzymać 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-mannopiranozyd 2-bromoetylu z bardzo niską wydajnością (8%), stąd otrzymałam go w reakcji D-mannozy z 2-bromoetanolem w obecności chlorku acetylu jako aktywatora z 60% wydajnością. 2',3',4',6'-Tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd 2-bromoetylu i 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glukopiranozyd 2-bromoetylu poddane zostały reakcji z trimetyloaminą w etanolu oraz z pirydyną w celu określenia wpływu podstawnika cukrowego na przebieg reakcji czwartorzędowania. Zarówno bromek 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glikopiranozyd 2-trimetyloamnioetylu (o konfiguracji D-galakto i D-gluko) jaki i bromek 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\beta$ -D-glikopiranozyd 2-pirydynioetylu (o konfiguracji D-galakto i D-gluko) uzyskałam z prawie ilościowymi wydajnościami (95%-99%). Bromek 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-mannopiranozyd 2-pirydynioetylu i bromek 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo- $\alpha$ -D-mannopiranozyd 2-trimetyloamnioetylu uzyskałam również z dobrymi wydajnościami (>85%). Odsunięcie o dwa atomy węgla od C-1 piranozy grupy odchodzącej (halogenu) ułatwia tworzenie projektowanych czwartorzędowych soli amoniowych. Wszystkie otrzymane, powyższe, związki zostały poddane reakcji de-*O*-acetylowania za pomocą metanolanu sodu w metanolu.

Czwartorzędowe bromki: 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo-D-glikopiranozyd 2-amonioetylu oraz D-glikopiranozyd 2-amonioetylu (o konfiguracji D-galakto, D-gluko i D-manno) zostały przebadane pod kątem aktywności mutagennej. Badania zostały wykonane we współpracy z Katedrą Biologii Molekularnej i Komórkowej na Międzyuczelnianym Wydziale

Biotechnologii UG-GUMed. W tym celu wykorzystano nowy test wykrywania substancji mutagennych na szczepach z wykorzystaniem zjawiska bioluminescencji bakterii *Vibrio harveyi*. Test wykazuje większą czułość i znacznie krótszy czas eksperymentów w stosunku do innych testów mutagenności. Wyniki dla każdej badanej substancji przedstawiono w postaci wykresu, który zobrazowano przy pomocy słupków (rys. 3, str. 276 [H-8]). Pierwszy słupek (K1-kontrola) odpowiada próbce zawierającej bakterie bez dodatku mutagenu stanowiąc tym samym kontrolę negatywną. Drugi słupek to K2-kontrola odpowiadająca próbce zawierającej bakterie z dodatkiem związku o znanej mutagenności: ICR-191 (dichlorowodorek 6-chloro-9-[3-(2-chloroetyloamino)propyloamino]-2-metoksy-akrydyny) stanowiący kontrolę pozytywną. Pozostałe słupki przedstawiają badany związek w pięciu różnych stężeniach. Wykresy przedstawiają zależność względnych jednostek światła RLU (Relative Light Units) od stężenia badanego związku. Wartości RLU są proporcjonalne do mutagenności badanego związku, a więc im wyższy słupek tym silniejsze działanie mutagenne. Wszystkie otrzymane bromki D-glikopiranozydów 2-amonioetylu wykazują działanie mutagenne, niektóre związki większe niż modelowy silny mutagen ICR. Sole o konfiguracji D-manno były zdecydowanie słabszymi mutagenami w porównaniu do soli o konfiguracji D-galakto i D-gluko, natomiast najsilniejszym mutagenem okazał się bromek 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo-β-D-glukopiranozyd 2-trimetyloamonioetylu. Wyniki wskazują na istotny wpływ konfiguracji atomu węgla C-2 glikopiranozy na aktywność mutageną. W celu weryfikacji otrzymanych wyników przeprowadziliśmy badania mutagenności w oparciu o „klasyczny” test Ames na szczepach *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100. Wyniki wskazują na brak czynności mutagennej otrzymanych związków. Jedynie w przypadku bromku 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo-β-D-galaktopiranozyd 2-trimetyloamonioetylu i bromku 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetylo-β-D-galaktopiranozyd 2-pirydynioetylu można zaobserwować nieznaczne właściwości mutagenne. Przeprowadzone badania okazały się niezwykle interesujące, gdyż w powszechnie używanym teście Ames związki nie wykazywały właściwości mutagennych, natomiast w czułym teście na szczepie A16 *Vibrio harveyi* wszystkie okazały się mutagenne, co wskazuje na wyższą czułość testu bioluminescencyjnego.

Badania prowadziłam w ramach projektu BW/8000-5-0114-8. Wyniki prac zostały opisane również w artykule książki „Na pograniczu chemii i biologii” [R-5].

## Podsumowanie i wnioski:

Przedmiotem moich badań była synteza, badanie struktur oraz biologicznych właściwości czwartorzędowych soli *N*-D-glikozylo-, *N*-D-gliko- i alditoliloamoniowych.

1. Opracowałam warunki reakcji czwartorzędowania na terminalnym atomie węgla w cukrach o konfiguracji D-gluko, D-rybo oraz w anhydroalditolach. Zgodnie z przewidywaniami zarówno struktura cząsteczki cukru jak i podstawnik przy anomerycznym atomie węgla mają wpływ na reakcje tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych. Istotny wpływ na efektywność syntezy soli ma także grupa odchodząca oraz rodzaj aminy.
2. Uzyskane czwartorzędowe sole *N*-D-gliko- i alditoliloamoniowe zostały poddane testom biologicznym. Badane związki nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej.
3. Zsyntezowałam bromki D-glikopiranozyd 2-amonioetylu o konfiguracji D-galakto, D-gluko oraz D-manno, które okazały się mutagenne w teście na szczepie A16 *Vibrio harveyi*.
4. Identyfikacji otrzymanych produktów dokonałam na podstawie analizy widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, widm homo- i heterokorelacyjnych, widm IR, widm masowych MALDI-TOF MS.
5. Dla czterech soli, tj. tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego, tosyłanu *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno- $\beta$ -D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowego, tosyłanu *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)trimetyloamoniowego i jodku *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)trimetyloamoniowego oraz dla dwóch substratów, tj. 1,4-anhydro-2,3-*O*-izopropylideno-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu i 1,4-anhydro-5-*O*-tosylo-D,L-rybitolu zostały wykonane badania rentgenostrukturalne. Analizy te potwierdziły budowę cząsteczek tych związków, a także pozwoliły ustalić upakowanie w komórce elementarnej kryształów. Pierścień piranozowy tosyłanu *N*-[(2,3,4-tri-*O*-acetylo-6-deoksy- $\beta$ -D-glukopiranozyd metylu)-6-ylo]trimetyloamoniowego przyjmuje niemal idealną konformację krzesłową  $^4\text{C}_1$  (identyczna z konformacją w jakiej występuje związek w roztworze). Pierścienie tetrahydrofuranowe w pochodnych anhydroalditoli przyjmują w kryształach konformację kopertową (E), jedynie jodek *N*-(1,4-anhydro-5-deoksy-2,3-*O*-izopropylideno-D,L-rybitol-5-ilo)trimetyloamoniowy przyjmuje w kryształach konformację skręconą ( $^0\text{T}_1$ ). Natomiast



pierścień furanozowy tosyłanu *N*-[(2,3-*O*-izopropylideno-β-D-rybofuranozyd metylu)-5-ylo]trimetyloamoniowego przyjmuje w kryształach konformację kopertową ( $E^1$ ).

6. Po raz pierwszy wykonano badania aktywności mutagennej czwartorzędowych soli amoniowych z wykorzystaniem bardzo czułego (1000-krotnie czulszy w porównaniu z testem Ames) i taniego testu na szczepie A16 *Vibrio harveyi*. Wyniki narzucają wręcz konieczność przebadania wszystkich czwartorzędowych soli amoniowych: dostępnych handlowo, wykorzystywanych w medycynie czy w życiu codziennym. We współczesnym świecie tysiące związków chemicznych (liczne czwartorzędowe sole amoniowe), między innymi: substancje lecznicze, środki ochrony drewna, środki dezynfekujące, chemikalia używane w gospodarstwie domowym są w powszechnym użyciu. Niektóre z tych związków mogą akumulować się w organizmie przez lata a następnie wywoływać działanie mutagenne. Również zanieczyszczenie środowiska naturalnego substancjami mutagennymi jest poważnym problemem ekologicznym, stąd bardzo ważna jest możliwość szybkiego ich wykrywania bez konieczności przeprowadzania bardzo drogich i skomplikowanych badań. Związki mutagenne są także zdolne do indukowania nowotworów, dlatego tak istotne jest określenie i zbadanie (za pomocą taniego i szybkiego testu) czy wszystkie związki handlowo dostępne są bezpieczne czy też mogą stanowić zagrożenie dla środowiska i zdrowia lub życia człowieka.

### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych:

Działalność naukową rozpoczęłam jako studentka chemii Wydziału Matematyczno-Fizyczno-Chemicznego, Uniwersytetu Gdańskiego. Egzamin magisterski po przedstawieniu pracy p.t.: „O przemianach wybranych bromków *N*-D-glikopiranozylo-pirydyniowych” zdałam 28 czerwca 1994 roku.

W październiku 1994 roku podjęłam naukę na studiach doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem mojej pracy doktorskiej był prof. dr hab. Andrzej Wiśniewski.

Przedmiotem badań mojej pracy doktorskiej były czwartorzędowe sole *N*-D-glikopiranozyloamoniowe a w szczególności *N*-D-glikopiranozylopirydyniowe, w których atom azotu bezpośrednio związany jest z anomerycznym atomem węgla cukru o konfiguracji D-galakto, D-gluko i D-manno. Zajmowałam się reakcją halogenków (bromki, chlorki) per-*O*-acetylo-D-glikopiranozyli z różnymi aminami aromatycznymi, w tym pirydyną i jej

pochodnymi. Stwierdziłam, że pochodne pirydyny z podstawnikiem w pozycjach 2 i 6 nie reagują z halogenkami per-*O*-acetyloglikopiranozyli. Charakterystyki związków dokonałam na podstawie widm IR, NMR i MALDI-TOF MS. Sygnały poszczególnych protonów przypisałam na podstawie widm homokorelacyjnych typu COSY, a atomów węgla na podstawie widm heterokorelacyjnych typu HSQC. Sole *N*-β-D-glikopiranozylopirydyniowe występują (zarówno w roztworze jak i w kryształach) w konformacji  ${}^4C_1$ , natomiast *N*-α-D-glikopiranozylopirydyniowe w zniekształconej konformacji krzesłowej  ${}^1C_4$ , za co odpowiada nietypowy aglikon i powodowany przez niego odwrotny efekt anomeryczny. Otrzymane sole *N*-D-glikopiranozylopirydyniowe poddałam przemianom z metanolanem sodu w metanolu, w wyniku czego uzyskałam anhydrocukry (substytucja wewnątrzcząsteczkowa) i *O*-glikozydy (substytucja międzycząsteczkowa). Wykorzystanie rozdziełań chromatograficznych w fazie gazowej z zastosowaniem wysoko polarnej kolumny kapilarnej oraz identyfikacja produktów badanych przemian metodą koiniekcji standardów umożliwiło mi badanie mechanizmów tych reakcji. Z przeprowadzonych przemian soli *N*-D-glikopiranozylopirydyniowych z metanolanem sodu w metanolu wynika, że pośrednie tworzenie 1,2-anhydro-D-glikopiranozy faworyzuje powstawanie 1,6-anhydro-D-glikopiranozy, co ma miejsce w przypadku anomeru β. Z kolei, przemiana anomeru α soli *N*-D-glikopiranozylopirydyniowej, mimo niemożliwości tworzenia się pośredniego produktu - 1,2-anhydro-D-glikopiranozy, prowadzi również do 1,6-anhydro-D-glikopiranozy. W kolejnym etapie przebadalam trwałość wiązania  $C_{an}-N^+$  w kationie *N*-D-glikopiranozylopirydyniowym w stosunku do czynników pozwalających funkcjonalizować grupy hydroksylowe cukru (*O*-acetylowanie, *O*-benzylowanie, *O*-metylowanie). Udowodniłam, że wszystkie z zastosowanych odczynników, poza bezwodnikiem octowym, naruszają wiązanie  $C_{an}-N^+$  soli *N*-D-glikopiranozylopirydyniowej. Jest to najbardziej wrażliwe miejsce tych soli, co nie pozwala na modyfikację części cukrowej już utworzonej soli. Jediną metodą sfunkcjonalizowania grup -OH jest wprowadzenie potrzebnych grup funkcyjnych w cząsteczce substratu, w pierwszym etapie, a następnie tworzenie wiązania C-N badanych soli. Wyniki prac zostały opublikowane w: I.a1., I.b1, I.b2., I.b3., II.21 (załącznik 3) oraz przedstawione na konferencjach międzynarodowych i krajowych w formie posterów [VII.a)1.- VII.a)5. (załącznik 3)].

Pracę doktorską zatytułowaną „O solach *N*-D-glikopiranozyloamoniowych” obroniłam 24 czerwca 1999 roku na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i uzyskałam stopień doktora nauk chemicznych. Recenzentami mojej pracy byli: prof. dr hab. inż. Juliusz Pernak,

Wydział Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej i prof. dr hab. Zygfryd Smiatacz, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

W lipcu 1999 roku (01.07.1999r. – 31.12.2000r.) wyjechałam na staż naukowy, do profesora Vicenta M. Monnier, Case Western Reserve University, Cleveland (USA), gdzie prowadziłam badania dotyczące możliwości wykorzystania kwasu 6-deoksy-6-fluoro-L-askorbinowego (F-Asc) do badania dróg degradacji witaminy C.

Metodę syntezy F-Asc opracował dr hab. Janusz Madaj, prof. UG, z naszego Zakładu a moim zadaniem było badanie dróg degradacji F-Asc a ściślej analiza produktów degradacji F-Asc ( $^{19}\text{F}$  NMR). Badania dotyczyły przemiany F-Asc w organizmach zwierzęcych oraz przemian F-Asc w soczewce oka. Do badań wybrano szczury, z których część stanowiła grupę kontrolną, a u części wywołano cukrzycę podając w drugim miesiącu życia streptozotocynę. W pierwszej kolejności badaliśmy poziom F-Asc w plazmie zwierząt (w grupie kontrolnej i u chorych). Stwierdziliśmy, że poziom podanego związku u zdrowych zwierząt jest znacznie wyższy, co mogło być wynikiem przyspieszonego wchłaniania przez komórki lub szybszego procesu degradacji i usuwania z moczem u chorych osobników. W moczu wydalonym przez zwierzęta stwierdziliśmy obecność kilkunastu związków zawierających fluor w tym 6 głównych, z których najbardziej interesowały nas dwa, tj. F-DKG (kwas 2,3-keto-L-gulonowy - DKG) i F-DHA (L-*treo*-heks-2,3-diulozono-1,4-laktonu - DHA). Do badań wykorzystano  $^{19}\text{F}$  NMR z włączoną funkcją rozpręgnięcia protonów, co znacznie podnosi czułość metody.

Następnie, przebadaliśmy stężenia F-Asc i F-DHA w szeregu tkanek: wątrobie, mózgu, nadnerczach, sercu, nerkach, śledzionie oraz plazmie szczurów (zdrowych i chorych). Obserwowaliśmy: niższą zawartość F-Asc w plazmie, znacznie większe stężenie w nadnerczach chorych szczurów, natomiast u zdrowych zwierząt znacznie większe stężenie F-Asc w nerkach i śledzionie. W większości narządów badany związek występował w swojej zredukowanej formie, z wyjątkiem serca, gdzie większe było stężenie formy utlenionej. Natomiast, w wydalonym przez zwierzęta moczu stwierdzono znacznie większe bogactwo produktów degradacji F-Asc. Potwierdziły się informacje o szybszej utracie analogu witaminy C w przypadku chorych zwierząt (po 24 godzinach 40% podanej porcji, a w przypadku zdrowych 18%). Porównując ilościowe zawartości produktów degradacji stwierdziliśmy, że było niższe u osobników chorych. Może to być wynikiem gorszego filtrowania przez nerki, wywołanego ich niewydolnością. Postawiliśmy pytanie czy proces degradacji nie jest

wynikiem przemian zachodzących już w samym moczu. Przeprowadziliśmy eksperyment polegający na inkubowaniu F-Asc w moczu zwierząt chorych i zdrowych. W obu przypadkach stwierdziliśmy (po 24 godzinach) zanik substancji wzorcowej i pojawienie się jednego produktu rozpadu dającego sygnał przy  $\delta$  212,4, który był również głównym produktem rozpadu w obecności jonów miedzi(II). Wyniki wskazują, że obserwowane produkty w moczu zwierząt nie są wynikiem wtórnej degradacji zachodzącej w moczu już po jego wydaleniu.

Kolejny cykl badań dotyczył przemian F-Asc w soczewce ludzkiego oka. Do badań wybrano komórki HLE-B3 (komórki ludzkiego nabłonka soczewki). W wyniku badań wykazaliśmy, że zarówno witamina C jak i F-Asc wykorzystują te same mechanizmy w pokonywaniu bariery błony komórkowej. Potwierdziliśmy istotny wpływ glutationu (GSH) na proces degradacji witaminy C. Kontynuując powyższe badania rozszerzyliśmy je na trzy linie komórkowe: HLE-B3, HTB-144 (kosmówczak ludzki) i 17EM15 (komórki nabłonka soczewki myszy). Uzyskane przez nas wyniki potwierdziły pojawiające się wcześniej w literaturze informacje, czas połowicznego przereagowania F-Asc wyniósł 22,3 a dla Asc 46,1 godziny. Wynik ten można tłumaczyć znacznie mniejszą trwałością F-DHA niż DHA. Może to wynikać z niemożności utworzenia przez F-DHA bardziej trwałej formy hemiketalowej z powodu braku grupy C-6-OH.

Aby poznać mechanizm transportu F-Asc przez błonę komórkową do komórek inkubowanych z F-Asc dodaliśmy inhibitora transporterów heksoz (cytocholazyny B). Okazało się, że zarówno F-Asc jak i F-DHA transportowane są przez błonę za pomocą transporterów zależnych od obecności jonów sodu.

Celem kolejnego zadania było określenie wpływu podwyższonego poziomu cukru (jak u diabetyków) na proces wchłaniania F-Asc i F-DHA. Komórki wstępnie inkubowano w roztworze D-glukozy lub D-galaktozy. W przypadku F-Asc nie zaobserwowaliśmy istotnego wpływu podwyższonego stężenia cukru na proces przemian. W przypadku F-DHA okazało się, że nadmierne stężenie cukru nie tylko nie wpływa na szybkość jego przenikania, ale również nie wpływa na jego przemianę w F-Asc. Ponadto potwierdził się kluczowy wpływ glutationu (GSH) na równowagę procesu degradacji F-Asc, jako związku odpowiedzialnego za proces redukcji F-DHA do F-Asc. Potwierdziliśmy również spostrzeżenie z innego doświadczenia, że w przypadku przemiany F-DHA nie powstaje nieznaną związek wykazujący sygnał przy  $\delta$  212,4 co potwierdza, że może on powstać tylko bezpośrednio z F-

Asc. W komórkach nie stwierdziliśmy też innych produktów rozpadu modyfikowanej fluorem witaminy C.

Podsumowując należy podkreślić, że kwas 6-deoksy-6-fluoro-L-askorbinowy (F-Asc) okazał się bardzo dobrym związkiem modelowym do badania przemiany witaminy C *in vivo*. Wykazaliśmy, że w większości organów witamina C jest przechowywana w postaci zredukowanej. Brak produktów rozpadu w tkankach badanych narządów może świadczyć, że są one praktycznie natychmiast wydalane z organizmu bądź są wiązane np. przez białka. Ważną informacją jest również fakt, że ilość wchłoniętego przez komórki F-Asc jest na poziomie pozwalającym na jego jakościowe i ilościowe oznaczanie przy użyciu <sup>19</sup>F NMR. Badania te przyniosły szereg interesujących wniosków. Przede wszystkim okazało się, że za transport przez błonę komórkową F-Asa i F-DHA w komórkach linii HLE-B3 odpowiedzialne są transportery zależne od jonów sodu. Ponadto stwierdzono, że wysokie stężenie cukru nie wpływa na przemiany F-Asc i że w komórkach występuje on głównie w zredukowanej postaci, a kluczową rolę w procesie równowagi F-Asc i F-DHA odgrywa GSH. Mimo, iż nie stwierdzono w komórkach obecności produktów degradacji F-Asc to wiadomo, że błona komórkowa nie stanowi dla nich bariery i mogą one przez nią przenikać.

W trakcie pobytu w Case Western Reserve University projekt mojego autorstwa „Ascorbate Oxidation in Diabetes” w 2000 roku został nagrodzony i finansowany z Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF File Number: # 3-2000-293). Projekt został również finansowany w kolejnym roku 2001 r. (I.2001 – XII.2001) i kontynuowałam tę tematykę po powrocie ze stażu, w Zakładzie Chemii Cukrów, Wydziału Chemii UG.

Powyższe wyniki zostały przedstawione w artykułach: I.b4., I.b5., I.b7.-I.b10. (załącznik 3) oraz na konferencjach: VII.b2.- VII.b4., VII.b16. (załącznik 3).

9 Lutego 2001 roku zostałam zatrudniona jako adiunkt w Katedrze Syntezy Organicznej (po zmianach organizacyjnych Katedra Chemii Organicznej) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Reakcja Mentschutkina (MR) jest jedną z najważniejszych metod tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych (CSA). Polega na nukleofilowym podstawieniu grupy odchodzącej, najczęściej halogenu, trzeciorzędową aminą. Wiadomo, że reakcja ta zachodzi według mechanizmu dwucząsteczkowego i prowadzi do utworzenia produktów obdarzonych ładunkiem. Z tego względu reakcja może zachodzić jedynie w bardzo polarnych

środowiskach. Studia teoretyczne skoncentrowano przede wszystkim na wpływie grupy odchodzącej oraz czynnika nukleofilowego. Badano pochodne halogenowe oraz szereg nukleofili takich jak: pirydyna, trimetyloamina, amoniak. Ponieważ reakcja prowadzona jest w roztworze, przebadany został również wpływ solwatacji. Początkowo obliczenia w roztworze wykonywano przy użyciu modelu solwatacyjnego, PCM (Polarizable Continuum Model). Następnie efekty solwatacyjne badano przeprowadzając obliczenia z udziałem kilku rzeczywistych cząsteczek rozpuszczalnika. Mniej uwagi poświęcono czynnikowi strukturalnemu, ograniczając badania do halogenków tetrametyloamoniowych. Innym sposobem tworzenia czwartorzędowych soli amoniowych jest wykorzystanie pochodnych sulfonianowych, najczęściej tosylianowych. Procedura została opisana w licznych publikacjach, jednak do tej pory nie doczekała się nawet pobieżnego opisu teoretycznego.

Zatem, postanowiliśmy przeprowadzić badania tworzenia CSA z sulfonianowych pochodnych. W celu uproszczenia modelu obliczeniowego reszta tosylianowa została zastąpiona resztą mesylianową. W przeprowadzonych obliczeniach badaliśmy tworzenie czwartorzędowych soli z pochodnych mesylianowych wybranych związków będących analogami odpowiednich pochodnych cukrów i anhydroalditoli. Interesował nas zarówno wpływ zmian struktury związków wyjściowych jak również wpływ czynnika nukleofilowego. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w dwóch publikacjach: I.b19. i I.b20. (załącznik 3).

Obliczenia zostały wykonane dwustopniowo. Wstępnie wszystkie punkty krytyczne na PES (Potential Energy Surface) zostały policzone metodą PM3. Uzyskane geometrie następnie zostały poddane reoptymalizacji z wykorzystaniem metod DFT (B3LYP/6-31+G\*\*). Ponieważ z literatury wiadomo, że funkcjonal B3LYP systematycznie zaniża wysokości barier aktywacji, odpowiednie bariery zostały policzone z wykorzystaniem funkcjonału MPW1K/6-31+G\*\*. Jak już wspomniałam tego typu reakcja wymaga obecności polarnego rozpuszczalnika stąd przeprowadzone zostały również obliczenia w modelu solwatacyjnym (PCM). Pełną optymalizację w rozpuszczalniku przeprowadziliśmy tylko dla jednej reakcji: pomiędzy mesylianem metylu a pirydyną. Wyniki te nie odbiegały od tych uzyskanych z tzw. obliczeń *single point*, stąd dalsze obliczenie ograniczyliśmy jedynie do *single point*.

W publikacji I.b19. (załącznik 3) zamieściliśmy wyniki obliczeń reakcji tworzenia mesylianu: tetrametyloamoniowego, *N*-((*S*)-tetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowego, *N*-((2*S*,5*S*)-5-metylotetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowego,



*N*-((2*S*,5*R*)-5-metoksytetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowego (rys. 1, str. 55). Porównując nasze wyniki z literaturowymi (w odniesieniu do reakcji tworzenia mesylanu tetrametyloamoniowego) wykazaliśmy, że zamiana grupy odchodzącej (halogenu na mesylan) prowadzi do obniżenia barier energetycznych. Ponadto pokazaliśmy, że rozgałęzienie przy węglach  $\beta$  i  $\delta$  ma zauważalny wpływ na wysokości barier energetycznych. O ile wpływ rozgałęzienia przy węglu  $\beta$  jest bardzo wyraźny, to w przypadku rozgałęzienia przy dalszym atomie węgla wpływ ten jest nieznaczny. Wpływ podstawnika przy węglu tak bardzo oddalonym od centrum reakcji wynika z faktu, że zarówno węgiel stanowiący centrum reakcji jak również podstawnik przy węglu  $\delta$  są po tej samej stronie pierścienia tetrahydrofuranowego, w orientacji *cis*.

W publikacji I.b20. (załącznik 3) zaprezentowaliśmy wyniki obliczeń reakcji tworzenia mesylanu: *N*-metylopirydyniowego oraz *N*-((*S*)-tetrahydrofuran-2-yl)metylopirydyniowego (rys. 1, str. 86). Przede wszystkim pokazaliśmy wpływ zmiany nukleofila. Stwierdziliśmy, że zastąpienie trimetyloaminy pirydyną skutkuje podwyższeniem bariery energetycznej badanej przemiany, co koreluje z zasadowością tych amin w fazie gazowej.

### Obecnie prowadzone są badania dotyczące:

1. Opracowania warunków reakcji fosforylacji wcześniej zsyntezowanych czwartorzędowych soli *N*-D-glikopiranozyloamoniowych o konfiguracji D-galakto, D-gluko i D-manno oraz soli alditoliloamoniowych w celu otrzymania nowych pochodnych i przebadania ich właściwości mutagennych. Jako wstęp do powyższych reakcji opracowałam warunki tworzenia 5-amonium-1,4-anhydro-2-deoksy-3-*O*-hydroksyoksydofosforylo-D-*erythro*-pentitolu. Wynik został przedstawiony jako zgłoszenie patentowe (ZP2). Pierwsze badania zostały wykonane w ramach projektu BW/8000-5-0252-9 oraz BW/8451-5-0452-0.

Sole fosforanowe, mogą okazać się skuteczne w walce z mikroorganizmami. Wynika to z wysokiej aktywności biologicznej i powinowactwa do pochodnych kwasów fosforowych budujących ścianę i błonę komórkową bakterii. Biorąc pod uwagę powyższe kwestie, należy dążyć do zsyntezowania takiego związku–antybiotyku, który łączyłby zalety obu grup związków zwłaszcza, że cukrowe połączenia czwartorzędowych soli amoniowych z grupami fosforowymi stanowią analogi naturalnie występujących nukleozydów.

2. Syntez związków, w których czwartorzędowy atom azotu oddalony jest od anomerycznego atomu cząsteczki cukru poprzez sześciowęglowy i jedenastowęglowy alkoksylowy linker. Tworzenie bromku  $\beta$ -D-glukopiranozyd 6-amoniheksylu oraz bromku  $\beta$ -D-glukopiranozyd 11-amonioundecylu (heksopiranozydów) celem określenia wpływu długości takiego linkera w powyższej czwartorzędowej soli amoniowej na właściwości mutagenne.
3. Syntez bromków  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-ksylopiranozyd 2-amonioetylu (pentopiranozydów) w celu przebadania wpływu braku grupy CH<sub>2</sub>OH w pierścieniu piranozowym na właściwości mutagenne.
4. Syntez czwartorzędowych soli pochodnych: 1,4-anhydro-D,L-galaktitolu, 1,5-anhydro-D-galaktitolu, 1,5- oraz 2,5-anhydro-D-mannitolu, 2-deoksy-D-*arabino*-heksitolu, 1,5-anhydro-D-*arabino*-heksitolu oraz pochodnych dianhydroheksitoli w celu przebadania potencjalnych właściwości biologicznych (praca doktorska wykonywana przez mgr Karola Sikorę, którego jestem promotorem pomocniczym).
5. Syntez czwartorzędowych soli pochodnych wankomycyny (fragment projektu *UDA-POIG.01.01.02-14-102/09-01* współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego 01.01.2010-31.12.2014 „Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej”).
6. Badań tworzenia mesylanów *N*-(3,4-*O*-izopropylideno-(*S*)-tetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowych, *N*-(3,4-*O*-izopropylideno-(2*S*,5*S*)-5-metylo-tetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowych, *N*-(3,4-*O*-izopropylideno-(2*S*,5*R*)-5-metoksytetrahydrofuran-2-yl)metylo-*N,N,N*-trimetyloamoniowych metodą chemii komputerowej.
7. Ponieważ wykazaliśmy mutagenność badanych związków, na szczepie A16 *Vibrio harveyi* w teście bioluminescencyjnym, wydaje się uzasadnione poznanie mechanizmu ich działania. Pierwszym etapem takich badań będzie analiza bezpośrednich oddziaływań badanych związków z DNA z wykorzystaniem technik laboratoryjnych (np. spektroskopowych czy kalorymetrycznych) oraz metod obliczeniowych (np. modelowanie molekularne czy też analiza układów w oparciu o matematyczne modele termodynamiczne). W przypadku stwierdzenia wiązania badanych związków z DNA, korzystając z powyższych metod będziemy wyznaczać stałe asocjacji oraz entalpie tworzenia powstających kompleksów.

**Literatura cytowana:**

- [1] G. Jones, *Pyridines and their Benzo Derivatives in Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Ed. A. R. Katritzky and Ch. Rees, **vol.2**, Part 2A, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt 1984, 395.
- [2] W. Śliwa, *N-Substituted Salts of pyridine and related compounds*, WSP, Częstochowa, Poland, ISBN 83-7098-198-4, 1996.
- [3] E. Obłąk, A. Gamian, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2010, **64**, 201.
- [4] W. Jerzykiewicz, W. Misiury, M. Kozupa, *Chemik*, 1993, **2**, 31.
- [5] D. Landini, A. Maia, A. Rampoldi, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 3187.
- [6] E. Fischer, K. Raske, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1910, **43**, 1750.
- [7] M. L. Sinnott, S. G. Withers, *J. Biochem.*, 1974, **143**, 751.
- [8] R. U. Lemieux, A. R. Morgan, *Can. J. Chem.*, 1965, **43**, 2205.
- [9] R. U. Lemieux, A. R. Morgan, *Can. J. Chem.*, 1965, **43**, 2214.
- [10] R. U. Lemieux, J. W. Lown, *Can. J. Chem.*, 1963, **41**, 889.
- [11] A. C. West, C. Schuerch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**:4, 1333.
- [12] O. Kirk, F. D. Pedersen, C. C. Fuglsang, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 1645.
- [13] H. Finklestein, *Ber.*, 1910, **43**, 1528.
- [14] J. B., Conant, W. R. Kirner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1924, **46**, 323.
- [15] S. Tanimori, T. Ohta, M. Kirihata, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 1135.
- [16] L. D. Hall, D. C. Miller, *Carbohydr. Res.*, 1975, **40**, C1-C2.
- [17] T. A. Blizzard, R. M. Kim, J. D. Morgan, II, J. Chang, J. Kohler, R. Kilburn, K. Chapman, M. L. Hammond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 849.
- [18] M. H. McCormick, W. M. Stark, G. E. Pittenger, R. C. Pittenger, G. M. McGuire, *Antibiot. Annu.*, 1955, 606.
- [19] R. Nagarajan, A. A. Schabel, F. T. Occolowitz, F. T. Counter, J. L. Ott, *J. Antibiot.*, 1988, **41**, 1430.
- [20] R. Nagarajan, A. A. Schabel, F. T. Occolowitz, F. T. Counter, J. L. Ott, A. M. Felty-Duckworth, *J. Antibiot.*, 1989, **42**, 63.
- [21] S. J. Mantell, P. S. Ford, D. J. Watkin, G. W. J Fleet, D. Brown, *Tetrahedron*, 1993, **49**, 3343.
- [22] K. H. Kang, M. Y. Cha, A. N. Pae, K. I. Choi, Y. S. Cho, H. Y. Koh, B. Y. Chung, *Tetrahedron. Lett.*, 2000, **41**, 8137.
- [23] T. Abel, J. I. Cohen, R. Engel, M. Filshinskaya, A. Melkonian, K. Melkonian, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 2495.
- [24] M. Thomas, D. Montenegro, A. Castaño, L. Friedman, J. Leb, M. L. Huang, L. Rothman, H. Lee, C. Capodiferro, D. Ambinder, E. Cere, J. Galante, J. Rizzo, K. Melkonian, R. Engel, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1620.
- [25] Ch. Liu, H. Baumann, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 2229.
- [26] A. F. Preston, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1983, **60**, 567.
- [27] D. Demberelnyamba, K.-S. Kim, S. Choi, S.-Y. Park, H. Lee, Ch.-J. Kimb, I.-D. Yoob, *Bioorg. & Med. Chem.*, 2004, **12**, 85.
- [28] Z. Guo, R. Xing, S. Liu, Z. Hong, X. Ji, L. Wang, P. Li, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 2390.
- [29] Ö.V. Rúnarsson, J. Holappa, C. Malainer, H. Steinsson, M. Hjálmarsdóttir, T. Nevalainen, M. Másson, *Eur. Polymer J.*, 2010, **46**, 1251.
- [30] J. Chlebicki, J. Węgrzyńska, *Czwartorzędowe sole amoniowe*, Poznań 2005, 93.
- [31] T. Piskorska, E. Obłąk, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2010, **64**, 161.
- [32] O. Kirk, F. D. Padersen, C. C. Fuglsan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 1645.

Barbara Dmochowska

Yolauisk, 28.05.2012r.