



Projekt „Cukry jako surowce odnawialne w syntezie produktów o wysokiej wartości dodanej”
realizowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
POIG.01.01.02-14-102/09

Lider Projektu: Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

Synteza chlorowodorku O³-(2-amino-2-deoksy-β-D-glukopiranozylo) diosgeniny (DsO-β-GlcNH₂ · HCl) i jego wybranych pochodnych oraz badania ich właściwości przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych

Henryk Myszka, Daria Grzywacz, Beata Liberek i Andrzej Nowacki
Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
E-mail: myszka@chem.univ.gda.pl

Glikozydy zawierające jako aglikon resztę diosgeniny należą do grupy związków zwanych saponinami. Fragment hydrofilowy składa się zwykle z jednej lub kilku jednostek cukrowych. Od dawna znane są ich właściwości lecznicze, zwłaszcza w medycynie ludowej krajów Dalekiego Wschodu. Bywają tam stosowane jako leki przeciw malarii, odtrutki przeciwko jadom węży i owadów. Zwiększone zainteresowanie tą grupą związków wynika z faktu, iż posiadają one także właściwości bakteriobójcze i przeciwgrzybicze. Jednak najbardziej obiecującymi wydają się być ich właściwości przeciwnowotworowe *in vitro* i *in vivo*. W wielu pracach wykazano, że istnieje silny związek między aktywnością glikozydów diosgenyłu a ich budową.

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



Costus speciosus



Trillium tschonoskii



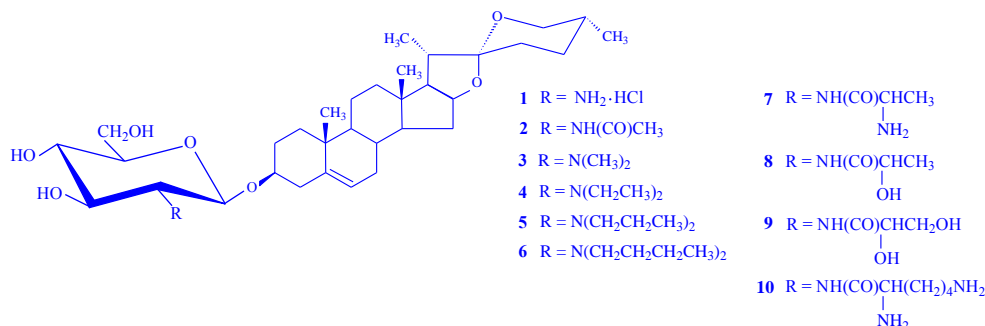
Dioscorea bulbifera



Paris polyphylla

Otrzymywane są również na drodze syntezy chemicznej. Synteza daje możliwości uzyskania analogów nie występujących naturalnie, często o innej aktywności farmakologicznej. Metody chemiczne pozwalają także modyfikować cząsteczkę glikozydu, zwykle jego część cukrową, szczególnie gdy ten fragment zawiera grupy aminowe. Wśród glikozydów diosgenyłu wyodrębnionych z materiału biologicznego nie znaleziono jeszcze połączeń z aminocukrami.

Syntezę glikozydów diosgeniny, w których reszta D-glukozaminy połączona jest z diosgeniną opracowano w naszym laboratorium, uzyskując tytułowy chlorowodorek (DsO-β-D-Glc-NH₂ · HCl) oraz kilkanaście jego pochodnych. Synteza glikozydu **1** polega na umiejętnym połączeniu odpowiedniej pochodnej D-glukozaminy z diosgeniną a następnie usunięciu osłon z grup -OH oraz z funkcji aminowej. Z kolei jego pochodne zawierające przy atomie węgla C-2: grupę acetamidową (acetylowanie Ac₂O), ugrupowania *N,N*-dialkilowe (redukcyjne alkilowanie) oraz reszty L-amino-kwasów i hydroksykwasów (wiązananie amidowe) otrzymaliśmy w wyniku modyfikacji funkcji aminowej w części sacharydowej saponiny **1** (związki **2 ÷ 10**).



Glikozydy **1** ÷ **10** badano pod kątem ich aktywności biologicznej, przeprowadzając badania mikrobiologiczne na szczepach referencyjnych dwóch grzybów z rodziny *Candida* oraz wybranych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Badania polegające na oznaczeniu minimalnego stężenia hamującego (MIC) przeprowadzono na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej (MIC) glikozydów diosgenyłu.

Zw.	R	<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>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	NH ₂ ·HCl	2	0,5	8	16	16	16	16	1024	512	> 1024	> 1024	1024
2	NH(CO)CH ₃	256	256	> 1024	512	512	> 1024	> 1024	1024	1024	> 1024	> 1024	1024
3	N(CH ₃) ₂	2	1	8	32	64	32	64	1024	1024	> 1024	> 1024	> 1024
4	N(CH ₂ CH ₃) ₂	2	1	32	32	16	32	32	1024	512	> 1024	> 1024	1024
5	N(CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂	4	4	16	8	16	8	32	1024	1024	> 1024	> 1024	> 1024
6	N(CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂	8	8	16	8	16	8	8	1024	512	> 1024	> 1024	1024
7	NH(CO)CH(NH ₂)CH ₃	4	1	8	4	8	4	4	1024	> 1024	> 1024	> 1024	1024
8	NH(CO)CH(OH)CH ₃	512	256	1024	1024	512	1024	1024	1024	> 1024	> 1024	> 1024	1024
9	NH(CO)CH(OH)CH ₂ OH	8	1	1024	256	64	256	512	1024	> 1024	> 1024	> 1024	1024
10	NH(CO)CH(NH ₂)(CH ₂) ₄ NH ₂	64	16	32	64	64	64	32	1024	> 1024	1024	> 1024	1024

Wśród 10 saponin zaobserwowano różną aktywność w stosunku do grzybów i bakterii, przy czym nie wykazują one aktywności w stosunku do bakterii Gram-ujemnych. Najwyższą aktywność wykazuje podstawowy glikozyd, tj. chlorowodorek **1**. Większość saponin, z wyjątkiem **2** i **8**, jest aktywna wobec grzybów gatunku *Candida*, a w stosunku do bakterii Gram-dodatnich aktywność wykazują **1**, **3** ÷ **7** i **10**. Wśród *N,N*-dialkylowych pochodnych aktywniejsze są saponiny o krótkim łańcuchu węglowym (związki **3** ÷ **5**). Dobre wyniki uzyskano także dla saponiny **7** zawierającej przy atomie węgla C-2 D-glukozaminy resztę L-alaniny.

Tabela 2. Wyniki aktywności przeciwgrzybiczej (MIC) wybranych glikozydów diosgenyłu na szczepach klinicznych.

R	<i>C. glabrata</i>			<i>C. krusei</i>			<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. tropicalis</i>			
	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	
1	NH ₂ ·HCl	0.25-8	2	4	0.5-1024	16	1024	1-512	2	4	0.5-1024	4	1024
3	N(CH ₃) ₂	0.5-8	4	4	2-1024	16	1024	0.5-128	1	2	2-1024	4	1024
4	N(CH ₂ CH ₃) ₂	0.5-8	4	4	2-1024	64	1024	1-256	2	4	2-1024	4	512
5	N(CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂	0.5-256	4	8	4-1024	1024	1024	2-256	4	4	4-1024	8	1024
6	N(CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃) ₂	1-512	8	16	8-1024	1024	1024	4-256	8	16	4-1024	128	1024

Pozytywne wyniki badań aktywności wobec szczepów referencyjnych skłoniły nas do przeprowadzenia podobnych testów aktywności przeciwgrzybiczej wybranych glikozydów (**1**, **3** ÷ **6**) na szczepach klinicznych grzybów *Candida*. Minimalne stężenie hamujące (MIC) zostało oznaczone dla pięciu wybranych glikozydów diosgenyłu, tych które cechowała najlepsza aktywność wobec

szczepów referencyjnych (Tabela 2) oraz dla sześciu leków przeciwgrzybowych stosowanych w konwencjonalnym leczeniu (Tabela 3). MIC zostało oznaczone zgodnie procedurami rekomendowanymi przez CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Tabela 3. Aktywności przeciwgrzybicza (MIC) wybranych leków.

	<i>C. glabrata</i>			<i>C. krusei</i>			<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	zakres	50%	90%	ATCC 10231	PCM 2680
Amfoterycyna B	1-4	2	2	1-2	2	2	1-4	2	4	0.5-4	1	2	1	1
Klotrimazol	0.25-16	4	8	0.25-2	0.25	0.25	0.25-32	0.25	0.25	0.25-16	4	16	16	4
Flukonazol	1-512	128	128	16-128	32	64	2-256	4	8	32-1024	128	1024	32	16
Itrakonazol	0.25-128	4	32	0.25	0.25	0.25	0.25-512	0.25	0.25	0.25-1024	256	1024	8	0.25
Natamycyna	1-4	2	2	1-2	1	1	2-4	4	4	2-4	2	4	2	1
Nystatyna	1-16	8	8	1-4	2	4	2-8	4	8	1-8	2	4	2	1

Badane szczepy referencyjne z rodzaju *Candida* były wrażliwe na działanie zarówno saponin jak i konwencjonalnych środków przeciwgrzybiczych. Glikozydy **1**, **3** i **4** wykazały nieco wyższą aktywność w porównaniu z pozostałymi związkami. Wiele szczepów klinicznych *C. krusei* i *C. tropicalis* charakteryzowało się obniżoną wrażliwością na działanie steroidowych saponin. Liczne szczepy *C. krusei* były także mniej wrażliwe na flukonazol, natomiast wśród *C. tropicalis* zidentyfikowano wiele opornych na flukonazol oraz itrakonazol.

Badane saponiny wykazały bardzo silną aktywność przeciwgrzybiczą w stosunku do *C. glabrata* i *C. parapsilosis*. Aktywność ta była porównywalna lub wyższa niż konwencjonalnych środków przeciwgrzybiczych. Zidentyfikowano szczepy *C. glabrata* i *C. parapsilosis* oporne na działanie azolowych leków przeciwgrzybiczych. Oporność na te związki jest zapewne następstwem ich rozpowszechnionego użytku w lecznictwie. Może być ona związana z mechanizmem usuwania leku z komórek za pośrednictwem błonowej pompy jednokierunkowej (z ang. *drug efflux pump*). Pozostałe związki przeciwgrzybicze okazały się aktywne w stosunku do wszystkich badanych szczepów.

Otrzymane wyniki zachęcają do kontynuacji badań steroidowych saponin pod kątem ich potencjalnego zastosowania w terapii kandydoz.