



UNIwersytet  
Warszawski



Warszawa, dn. 14.09.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Magdaleny Welke, zatytułowanej  
„Badania aminokwasowych pochodnych flawonu”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Welke jest wynikiem pracy wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika pod kierunkiem naukowym prof. dr. hab. Andrzeja Wojtczaka.

Układ pracy jest klasyczny. Podzielona jest formalnie na dwie części: literaturową oraz doświadczalną. Pierwsza z nich jest bardzo zwięzła i liczy 17 stron. Kończą ją cele pracy. W drugiej części zawarta jest część metodologiczna, synteza pochodnych flawonu uwzględniająca syntezę tetrafluoroboranów 4-etoksy-2-fenylchromenyliowych oraz syntezę aminokwasowych pochodnych flawonu, jak również ich charakterystykę spektroskopową (NMR i IR). Kolejną część stanowią badania strukturalne oraz badania aktywności biologicznej. Pracę kończy dyskusja wyników, wnioski, streszczenie, abstrakt w języku angielskim, licząca 97 pozycji literaturowych bibliografia, jak również dodatek zawierający tabele wiązań wodorowych i numery depozytowe badanych struktur w bazie danych strukturalnych Cambridge Structural Database. Całość liczy 119 stron. W przedstawionej pracy brakuje informacji o dorobku naukowym kandydatki. Przejrzenie zasobów baz danych literaturowych wskazuje, iż doktorantka jest autorką jednej pracy w *Applied Catalysis A: General* (2009).

Tematyka pracy doktorskiej jest bardzo interesująca. Dotyczy badania pochodnych flawonu, ważnych układów o dużym znaczeniu biologicznym/farmaceutycznym. Wiąże ze sobą syntezę molekularną, badania strukturalne, uwzględniając rentgenowską analizę strukturalną oraz badania spektroskopowe, dokowanie molekularne i badania biologiczne.

Część literaturowa stanowi bardzo zwięzłe wprowadzenie zarówno do tematyki badań jak i używanych narzędzi. Pierwszy fragment przedstawia ogólną wiedzę dotyczącą

Prof. dr hab. Michał K. Cyrański  
Pasteura 1  
02-093 Warszawa  
e-mail: mkc@chem.uw.edu.pl  
Tel: 22 55 26 360

flawonoidów a w szczególności ich występowania w przyrodzie, znaczenia dla zdrowia człowieka, budowy chemicznej, aktywności biologicznej i właściwości fizykochemicznych. Drugi fragment poświęcony jest podstawom teoretycznym rentgenowskiej analizy strukturalnej. Fragment ten napisany jest bardzo lakonicznie. Rozumiem konieczność odpowiedniego wyboru treści, jednak nie do końca jest dla mnie oczywiste dlaczego doktorantka nie zaczyna od opisu zjawiska dyfrakcji a od problemu fazowego. Być może wynika to z zafascynowania doktorantki tym zagadnieniem – w końcu jego rozwiązanie zostało uhonorowane Nagrodą Nobla dla Jerome Karle i Herberta Hauptmana (1985). W tym miejscu chciałbym zauważyć, iż obecnie coraz większe znaczenie zyskują inne metody oparte na zgadywaniu faz, charge flipping, zaś metoda Pattersona *sensu stricte* jest swego rodzaju obejściem problemu fazowego a nie jego rozwiązaniem. Choć dla specjalistów sprawa jest oczywista, wzmianka dlaczego atomy wodoru są najczęściej udokładniane w modelu izotropowym (stosowane niekiedy są również bardziej zaawansowane modele udokładnienia) byłaby miłym ukłonem dla osób mniej zorientowanych w metodologii badań rentgenostrukturalnych. Zasadnym byłby również komentarz odnośnie oznaczenia struktury absolutnej w przypadku bardzo słabego sygnału anomalnego. Oczekiwałbym krótkiego komentarza podczas obrony pracy doktorskiej. Ponieważ jednym z niezwykle interesujących procesów, które muszą zachodzić w trakcie syntezy jest częściowa inwersja konfiguracji, w mojej ocenie omówienie chiralności powinno się znaleźć w części literaturowej pracy. Podczas publicznej obrony chciałbym by doktorantka omówiła w jaki sposób można śledzić zmiany konfiguracji przy użyciu również innych metod jak np. dichroizmu kołowego. Omawiając rolę różnych czynników decydujących o intensywności refleksów, stosowane poprawki, brakuje omówienia wpływu temperatury. Co więcej, w części metodologicznej brak jest również informacji w jakich warunkach temperaturowych zostały dokonane pomiary kryształów. W trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej chciałbym by doktorantka przeanalizowała wpływ temperatury zarówno na jakość danych dyfrakcyjnych jak i na finalny model struktury. W tym kontekście warto zastanowić się czy obniżenie temperatury pomiaru jest zawsze wskazane, biorąc pod uwagę możliwość tworzenia różnych odmian polimorficznych, ale również adekwatność finalnego modelu do rozważań w warunkach fizjologicznych. Opis podstaw rentgenowskiej analizy strukturalnej jest w mojej ocenie bardzo zwięzły, natomiast brakuje, choćby bardzo skrótowego, omówienia używanych metod spektroskopowych i dokowania molekularnego, narzędzi, które są stosowane przez doktorantkę.

Celem niniejszej pracy była synteza nowych aminokwasowych pochodnych flawonu oraz ich charakterystyka strukturalna i spektroskopowa. Obecność aminokwasu w łańcuchu bocznym może powodować zwiększenie rozpuszczalności układu flawonu, a co za tym idzie jego biodostępność. Ze względu na brak efektów ubocznych reszt aminokwasowych układy analizowane przez doktorantkę mogą stanowić ważne związki o znaczeniu farmaceutycznym. Dodatkowym elementem pracy było zatem sprawdzenie biodostępności układów oraz aktywności biologicznej w szczególności w oddziaływaniu z enzymami wiążącymi ATP lub ADP. Całość dopełnia dokowanie molekularne jednej z pochodnych (*mw10ala*) do enzymu apirazy, który uważa się, iż zapobiega zawałom serca. Z moich obliczeń wynika, iż w ramach pracy doktorantka uzyskała 44 układy, z czego 40 stanowi związki nowe (7 tetrafluoroboranów 4-etoksy-2-fenylchromenyliowych + 11 nie scharakteryzowanych związków otrzymanych z niską wydajnością (posiłkując się schematem 7.2.1), oraz 26 aminokwasowych pochodnych flawonu (posiłkując się schematem 7.2.2, włączając również 2 nieujęte przez nią układy otrzymane w wyniku krystalizacji). Te ostatnie to pochodne alaniny, leucyny i waliny. Za bardzo niefortunne uważam nazewnictwo rozważanych układów. Rozumiem, że posługiwanie się skrótem *mw* może być przydatne w trakcie realizacji projektu, jednak przekształcenie enumeracji struktur na bardziej uniwersalny zapis, w mojej ocenie spowodowałoby zwiększenie czytelności pracy. Za niefortunne również uważam podawanie obecności rozpuszczalnika w nazewnictwie otrzymanych układów (np. Tabela 7.1), zwłaszcza, iż w przypadku niektórych związków krystalizacja prowadzi do innej stechiometrycznej liczby cząsteczek rozpuszczalnika. Tak jest np. w przypadku związku *mw10ala* opisanego na stronie 29 (por. również Tabela 7.1) gdzie związek ten zawiera 2 cząsteczki  $H_2O$ , zaś na tej samej stronie (str. 29) jest również informacja, iż w wyniku krystalizacji z DMSO doktorantka otrzymała związek z 1,5 cząsteczką  $H_2O$ . Podobnie jest w przypadku *mw15ala*·3,5· $H_2O$  – w wyniku krystalizacji otrzymała układ *mw15ala*·2,5· $H_2O$  (str. 31), zaś w przypadku *mw16leuBF<sub>4</sub>* związek o zupełnie innej budowie (*mw16leu*· $H_2O$ )<sub>2</sub> (str. 34). Również w wyniku krystalizacji *mw24leuBF<sub>4</sub>* doktorantka otrzymała *mw24leu*· $H_2O$  (str. 38). Biorąc pod uwagę otrzymane w wyniku krystalizacji układy *mw16leu* oraz *mw24leu* dziwi mnie brak uwzględnienia ich na rysunku 7.2.1 oraz w Tabeli 7.1. Na marginesie pragnę dodać, iż w Tabeli 7.1 brakuje również związku *mw13* opisanego na rysunku 7.1.1. oraz na stronie 25. Cztery z układów: *mw10* i *mw26* oraz *mw10val* i *mw26val* stanowią związki znane wcześniej, o czym kandydatka wspomina na stronach 19 i 91. Doktorantka bardzo skrupulatnie wykonała wszystkie syntezy. Reakcje którymi się posiłkowała były literaturowe. Są to syntezy dwuetapowe. Nie udało

się jej uzyskać wydajności podobnych do raportowanych wcześniej, co wynika z różnic wydajności pierwszego etapu syntezy. Na podstawie przeprowadzonych skrupulatnych analiz doktorantka wnioskuje, iż wydajności literaturowe były prawdopodobnie zawyżone.

W ramach pracy doktorantka wykonała analizę strukturalną 18 układów metodą dyfrakcji rentgenowskiej na monokryształach. Nie wszystkie analizowane układy były flawonoidami. Osobiście nie do końca jestem przekonany, że trzeba było analizować dodatkowe produkty otrzymane w trakcie syntezy pochodnych flawonu, jednak przedstawiona analiza jest bardzo interesująca. Doktorantka wykazała, iż uzyskane przez nią pochodne aminokwasowe mają postać jonów obojnaczych, zaś oddziaływania polarne stabilizują sieć krystaliczną. W większości przypadków zaobserwowała obecność międzycząsteczkowego wiązania wodorowego pomiędzy atomem azotu i atomem tlenu grupy karboksylanowej. Poza *mw24leu* nie obserwuje się w kryształach oddziaływań typu  $\pi$ - $\pi$  wynikających ze *stackingu* fragmentów aromatycznych. Na podstawie analiz struktur krystalicznych doktorantka potwierdziła hybrydyzację  $sp^2$  atomu azotu oraz wykazała, iż charakter elektronu donorowy/akceptorowy podstawnika w pozycji C6 wpływa na delokalizację elektronów w pierścieniu heterocyklicznym. Skutkuje to zmianami długości wiązania C4=N1 (C24=N2) oraz wartości kąta C3-C4-C4A (C23-C24-C24A). Dodatkowo doktorantka wskazuje, iż orientacja pierścienia bocznego B flawonu jest efektem upakowania przestrzennego, na którą mają wpływ oddziaływania steryczne z atomami wodoru w pozycji C3 jak również oddziaływania z łańcuchami bocznymi podstawników aminokwasowych. Najbardziej interesującym elementem analizy jest to, że pochodne aminokwasowe nie krystalizują w grupach Sohnkego. W sieci kryształu występują zatem obie odmiany enancjomeryczne, pomimo użycia w syntezie czystych optycznie aminokwasów. Doktorantka stawia tezę (posiłkując się również analizą tryptofanu, który otrzymała podczas próby syntezy pochodnej tryptofanowej *mw10*), iż prawdopodobną przyczyną racemizacji na atomie C $\alpha$  fragmentu aminokwasowego jest częściowe przeniesienie sprzężonego ładunku na podstawnik aminokwasowy w trakcie jego podstawiania w pozycję C4 pierścienia. Czy doktorantka mogłaby przedstawić jak mógłby wyglądać potencjalny mechanizm reakcji? Bardzo interesującym elementem analizy w mojej ocenie jest analiza aminokwasów w badanych układach i zauważenie, iż w strukturach pochodnych alanylowych i leucylowych, które wykryły z cząsteczkami  $H_2O$ , konformacje podstawników aminokwasowych spełniają warunki dla helisy białkowej. W przypadku *mw24ala*, gdzie w komórce elementarnej jest cząsteczka kwasu octowego podstawnik alanylowy przyjmuje konformację  $\beta$  kartki. W pozostałych strukturach oddziaływania z  $BF_4^-$  i  $DMSO$  zaburzają sieć

oddziaływać co powoduje, iż nie obserwuje się konformacji podobnych do białek. W mojej ocenie bardzo interesującym byłoby podjęcie dalszych prób krystalizacji, tak by otrzymać jedynie hydraty badanych układów. Analiza części krystalograficznej jest dokonana na ogół poprawnie, jednak w niektórych miejscach pojawiają się niejasności. Tak jest np. w opisie struktury *mw10ala*. Nie jest jasne dla mnie zdanie „część asymetryczną komórki elementarnej tworzą jon pochodnej alanynowej oraz dwie cząsteczki wody – jedna z obsadzeniem połówkowym”. Jaka jest zatem stechiometria tego układu 1:1,5? Z wcześniejszych opisów można domniemywać, iż jest to 1:2. Podobnie jest w przypadku *mw10val*, gdzie niezależną część komórki elementarnej tworzą jon i trzy cząsteczki wody, jedna z nich z obsadzeniem 50%. Myślę, że opis związków mogłyby dopełnić analizy upakowania wraz z zaznaczonymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi, np. wodorowymi czy innymi stabilizującymi sieć kryształu w formie graficznej (opisy oddziaływań występujących w kryształach są oczywiście w pracy zawarte). Takie upakowanie jest przedstawione przykładowo na rysunku 8.2.1.4, jednak brak jest zaznaczonych oddziaływań. Ponadto niektóre rysunki przedstawiające numerację atomów mogłyby być wykonane z większą starannością (np. rys. 8.2.15.1). Za niefortunną uważam numerację atomów na rysunku 8.2.1. W przypadku dwóch cząsteczek w niezależnej części lepszym sposobem numeracji byłoby zastosowanie symboli A i B. W Tabeli 8.1 podane są wzory sumaryczne poszczególnych układów, jednak wydzielenie liczby cząsteczek rozpuszczalnika mogłoby być pomocne w rozwianiu niektórych wątpliwości.

W ramach badań biologicznych, doktorantka wykazała, iż testy aktywności enzymu apirazy w obecności *mw10ala* i *mw10leu* wykazały niewielki inhibujący wpływ tych pochodnych na aktywność enzymu w reakcji hydrolizy ADP, zaś w testach prowadzonych na bakteryjnej kinazie adenylanowej wykazała, iż *mw10leu* częściowo znosi inhibujące działanie DMSO. Sugeruje to że układ ten może być albo słabym aktywatorem kinazy, albo, oddziałując z DMSO uniemożliwia jego interakcję z tym enzymem. Wykorzystując dokowanie molekularne *mw10ala*, jako liganda do enzymu apirazy doktorantka wykazała również możliwość modyfikacji jego aktywności. Badania te ujawniły jednak, iż efekt jest niewielki, co może być spowodowane niską rozpuszczalnością ewentualnie słabym wiązaniem w centrum katalitycznym. To bardzo ważne wyniki. Zwiększenie rozpuszczalności pochodnych flawonu nadal pozostaje jednym z perspektywicznych celów tej tematyki badawczej.

Generalnie praca jest napisana poprawnym językiem naukowym, choć zdarzają się niezręczności jak chociażby „(grupa hydroksylowa) tłoczy elektrony do pierścienia”,

co oznacza, iż ma elektronodonorowy charakter (str. 41; por również opis na stronie 79, czy str. 97). W Tabeli 8.1 wyrażenie „piki  $\Delta\rho$ ” powinno być raczej ujęte jako „największe maksimum i minimum na końcowej różnicowej mapie [ $e\text{\AA}^{-3}$ ]”. Brakuje również podania temperatury poszczególnych pomiarów. W mojej ocenie przydałby się również wykaz używanych w pracy akronimów i skrótów.

**Konkludując: stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Magdaleny Welke zawiera istotne elementy nowości naukowej. Doktorantka postawiła problem badawczy, wykazała się wiedzą w zakresie prezentowanej tematyki przedmiotu oraz odpowiednim warształem badawczym. Uważam, że uzyskane przez nią wyniki stanowią znaczący wkład w rozwój chemii, w szczególności układów o potencjalnym właściwościach farmaceutycznych i są inspirujące do podjęcia dalszych badań. To bardzo ciekawa tematyka badawcza o dużym potencjale również aplikacyjnym. W mojej ocenie praca doktorska mgr Magdaleny Welke spełnia warunki formalne przez obowiązującą ustawę o stopniach i tytułach naukowych. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Michał K. Cyrański