



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Paulina M. Dominiak
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Żwirki i Wigury 101
02-089 Warszawa
Tel.: 22 55 26 714
E-mail: pdomin@chem.uw.edu.pl

Warszawa, dn. 14.03.2022

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Iwony Budziak-Wieczorek pt.

„Biodostępność naturalnych związków bioaktywnych – badania fizykochemiczne i modelowe”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Daniela M. Kamińskiego, prof. UMCS na Wydziale Chemii
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Jednym z celów zrównoważonego rozwoju współczesnego świata jest zapewnienie wszystkim ludziom w każdym wieku zdrowego życia. Badania dotyczące substancji bioaktywnych zawartych w produktach pochodzenia naturalnego są jednym ze sposobów realizacji tego celu. Coraz więcej związków naturalnych znajduje zastosowanie w prewencji i leczenia różnorodnych chorób cywilizacyjnych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy badań w kierunku zwiększenia biodostępności wybranych naturalnych związków bioaktywnych. Doktorantka skupia się nad dwoma najważniejszymi czynnikami, które wpływają na biodostępność i które mogą podlegać optymalizacji w procesie produkcji leków doustnych. Czynnikiem tymi są: rozpuszczalność w roztworach wodnych i przenikalność przez bariery biologiczne. Związkami nad którymi skupiła się Doktorantka były wybrane naturalne flawonoidy oraz poliole. Te pierwsze wykazują działanie cytotoksyczne, przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, immunosupresyjne oraz chemoprewencyjne. Natomiast poliole stosowane są w produkcji leków jako substancje słodzące i stabilizujące, oraz potencjalnie mogą wpływać na rozpuszczalność substancji aktywnej leku.

Wobec powyższego stwierdzam, że tematyka rozprawy doktorskiej mgr Iwony Budziak-Wieczorek jest ważna i aktualna.

Rozprawę stanowi zbiór czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych autoreferatem. Mgr Iwona Budziak-Wieczorek jest pierwszą współautorką

wszystkich czterech artykułów, w tym jest również współautorką korespondencyjną w przypadku jednego z artykułów. Artykuły opublikowane zostały w międzynarodowych czasopismach naukowych (*ACS Omega*, *Molecules* and *BBA - Biomembranes*) znajdujących się na wykazie czasopism naukowych wydany przez Ministra Edukacji i Nauki w dniu 1 grudnia 2021 r.

Autoreferat liczy 40 stron i zawiera: Uzasadnienie wyboru tematu, Część literaturową, Cel pracy i tezy badawcze, Materiały i metody badawcze, Wyniki badań i omówienie najważniejszych wyników oraz Podsumowanie i wnioski. Dodatkowo, autoreferat opatrzone jest na początku wykazem skrótów stosowanych w autoreferacie, a na końcu spisem rysunków i bibliografią. Do rozprawy dołączony został Suplement zawierający streszczenie rozprawy w języku polskim, streszczenie rozprawy w języku angielskim i wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz informację o jej działalności popularyzującej naukę.

W pierwszym, półtorastronicowym rozdziale autoreferatu Doktorantka uzasadnia dlaczego podjęła się tematyki badawczej przedstawionej w rozprawie doktorskiej. Stwierdza, że naturalne flawonoidy stanowią bardzo obiecującą grupę związków bioaktywnych, ale ich słaba rozpuszczalność w roztworach wodnych utrudnia ich stosowanie w praktyce. Zwraca uwagę na obiecującą technikę, kokryształizację, która umożliwia modyfikację właściwości fizykochemicznych związku, ale nie zmienia jego właściwości farmakologicznych. W szczególności, w wielu przypadkach kokryształizacja umożliwia znaczące zwiększenie rozpuszczalności fazy krystalicznej. Konkluduje, że wiele naturalnych flawonoidów nie zostało przebadanych pod kątem modyfikacji ich właściwości fizykochemicznych i dlatego wartą podjąć się tej tematyki. Dotyczy to zarówno badań nad zwiększeniem rozpuszczalności flawonoidów w roztworach wodnych poprzez zmianę fazy krystalicznej jak i prób zrozumienia ich interakcji z błonami biologicznymi w oparciu o układ modelowy, w którym wykorzystuje się lepiej rozpuszczalne, ale zawierające również wiele grup hydroksylowych związki poliolowe.

Następny rozdział obejmuje dwanaście stron wstępu literaturowego, w którym Doktorantka przybliży dokładniej czym jest biodostępność, jakie są metody zwiększania biodostępności, w tym w szerszym ujęciu omawia metody kokryształizacji, oraz krótko prezentuje badane związki bioaktywne. Treść rozdziału jest odpowiednio dobrana, tak, aby następnie dobrze zrozumiane zostały cele i szczegółowe tezy rozprawy doktorskiej. Tekst jest ciekawy, merytorycznie poprawny, klarowny i przyjemnie się go czyta. Opatrzony jest odpowiednimi ilustracjami. W tekście dopatrzyłam się tylko jednej drobnej nieścisłości merytorycznej. Doktorantka wśród możliwych wiązań niekowalencyjnych wykorzystywanych w procesie tworzenia kokryształów wymienia słabe oddziaływania hydrofobowe, dodatkowo w nawiasie podając za przykład wiązania typu $\pi\cdots\pi$. Czy wiązania typu $\pi\cdots\pi$ są

rzeczywiście przykładem oddziaływań hydrofobowych? Czy oddziaływania hydrofobowe należą do kategorii wiązań niekowalencyjnych? Czy jednak mechanizm tworzenia oddziaływań hydrofobowych jest zupełnie inny?

W trzecim rozdziale bardzo klarownie przedstawione są cele pracy oraz wypisane szczegółowe tezy badawcze. Doktorantka postawiła przed sobą dwa cele badawcze. Pierwszym celem była „synteza nowych kokryształów wybranych naturalnych flawonoidów m.in. dwóch chalkonów ksantohumolu, kardamoniny oraz flawan-3-olu (-)epikatechiny i przedstawienie ich charakterystyki strukturalnej, spektroskopowej i fizycznej.” Drugim celem były „badania wpływu wybranych poliolei o silnych właściwościach hydrofilowych na organizację molekularną w mono-, dwu- i wielowarstwach lipidowych oraz wyznaczenie zależności przepuszczalności przez dwuwarstwę lipidową od długości wiązań oraz ilości grup hydroksylowych w łańcuch węglowym.” Zostały tutaj również wymienione cztery cząstkowe tezy badawcze:

- „Kokrystalizacja zwiększa rozpuszczalność wybranych chalkonów oraz flawan-3-oli i jest skuteczną metodą w opracowywaniu nowych formułacji o zwiększonej biodostępności.”
- „Istnieje zależność pomiędzy budową chemiczną chalkonu kardamoniny a niską rozpuszczalnością w roztworach wodnych.”
- „Poliole (ksylitol, erytrytol i mannitol) o właściwościach silnie hydrofilowych nie oddziałują z częścią hydrofobową lipidów oraz nie przenikają przez błony biologiczne.”
- „Stosowanie związków o właściwościach silnie hydrofilowych nie jest skuteczną metodą w opracowaniu modeli o zwiększonej biodostępności ze względu na niską przenikalność przez błony biologiczne.”

Metody badawcze stosowane przez Doktorantkę zostały wymienione w rozdziale czwartym (sześć stron) i bardzo skrótowo omówione. Doktorantka wymienia metody dyfrakcyjne (dyfrakcja rentgenowska monokryształów, proszkowa dyfrakcja rentgenowska), metody spektroskopowe (spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera, spektroskopia Ramana, spektroskopia elektronowa UV-Vis, spektroskopia fluorescencyjna), metody analizy termicznej (skaningowa kalorymetria różnicowa) oraz metody analizy powierzchni Hirshfelda, optymalizacji geometrii metodą DFT, analizy chemometrycznej i charakterystyki monowarstw Langmuira. Metody zostały przedstawione od strony użytkowej, niewątpliwie Doktorantka dobrze orientuje się w jakich celach stosuje się wymienione metody. Zabrakło mi jednak nieco jedno-dwuzdaniowego opisu podstaw fizycznych czy teoretycznych każdej z tych metod. Wkradły się też tutaj drobne nieścisłości. W opisie analizie dyfrakcji proszkowej Doktorantka stwierdza, że do jej wykonania nie ma potrzeby krystalizacji. Doktorantka zapewne miała na myśli, że nie ma potrzeby rekrytalizacji próbki w celu

osiągnięcia kryształów o większych rozmiarach. Natomiast w opisie analizy powierzchni Hirshfelda zapewne chodziło o opis oddziaływań występujących w badanym kryształ, nie w cząsteczce.

Rozdział piąty (16 stron) poświęcony jest przedstawieniu wyników badań Doktorantki i omówieniu najważniejszych z nich. Zbudowany jest z czterech podrozdziałów, gdzie każdy podrozdział poświęcony jest jednemu artykule naukowemu Doktorantki ze zbioru artykułów stanowiących niniejszą rozprawę doktorską. W dalszej części mojej recenzji, przedstawię moją połączoną opinię nt. treści poszczególnych podrozdziałów jak i całych artykułów naukowych.

Artykuł nr 1: „ Synthesis and Characterisation of a (-)-Epicatechin and Babituric Acid Cocrystal: Single-Crystal X-ray Diffraction and Vibrational Spectroscopic Studies” autorstwa Iwony Budziak-Wieczorek (autor korespondencyjny) i Urszuli Maciołek, opublikowany w ACS Omega 2021, 6, 8199-8209. W artykule przedstawiono metodę syntezy nowego kokryształu (-)-epikatechiny z kwasem barbiturowym oraz charakterystykę tego kokryształu pod kątem struktury trójwymiarowej, ze szczególnym uwzględnieniem geometrycznej i spektroskopowej analizy oddziaływań międzycząsteczkowych, temperatury topnienia i profilu rozpuszczalności. Analizę przeprowadzono w porównaniu do kryształów czystych komponentów. Za najciekawsze i najbardziej wartościowe wyniki tej pracy uważam: (a) synteze nowego kokryształu (-)-epikatechiny, (b) wykazanie zależności między różnicami w rozpuszczalności kokryształu i kryształu (-)-epikatechiny a oddziaływaniami międzycząsteczkowymi obserwowanymi w obu fazach. Pomimo, że nie udało się uzyskać formy krystalicznej (-)-epikatechiny wyraźnie lepiej rozpuszczalnej od czystej (-)-epikatechiny, uważam, że przedstawione badania poszerzają ogólną wiedzę w temacie kokryształizacji i rozpuszczalności.

W kontekście analizy oddziaływań nasunęły mi się następujące pytania do Doktorantki. Czym kierowała się definiując powierzchnię Hirshfelda dla dwóch cząsteczek (-)-epikatechiny, dwóch cząsteczek kwasu barbiturowego, czy całej zawartości części niezależnej komórki elementarnej kokryształu? Wybór części niezależnej kryształu jest w pewnym sensie arbitralny, nie jest niezmienną cechą kryształu. Czy uzyskane wyniki (i wnioski) nie zmieniłyby się nieco, gdyby wykonać analizę powierzchni Hirshfelda i częstości występowania różnych kontaktów dla pojedynczych cząsteczek?

Artykuł spełnia wszelkie wymogi formalne i merytoryczne artykułu naukowego dotyczącego nowych badań, co zostało niezależnie potwierdzone przez recenzentów tej publikacji. Artykuł udowadnia również, że mgr Iwona Budziak-Wieczorek nabyła umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, od postawienia ciekawej tezy badawczej, zaprojektowania adekwatnych eksperymentów, ich przeprowadzenia zgodnie ze sztuką, poprawnej analizy wyników i wyciągnięcia dobrze udokumentowanych wniosków. Ponieważ artykuł jest dwuautorski, nieco brakuje w autoreferacie oświadczenia wprost jakie były role poszczególnych współautorek artykułu.

Niemniej jednak bycie pierwszą i korespondencyjną autorką w artykule dwuautorskim bezspornie świadczy o tym, że mgr Iwona Budziak-Wieczorek odegrała znaczącą i wiodącą rolę w powstanie tego artykułu.

Artykuł nr 2: „Structure and Physical Properties of Cardamonin: A Spectroscopic and Computational Approach” autorstwa Iwony Budziak, Marty Archewskiej (autorka korespondencyjna) i Daniela M. Kamińskiego (autor korespondencyjny), opublikowany w *Molecules* 2020, 25, 4070. W artykule przedstawiono strukturę kryształów kardamoniny oraz przeanalizowano przy użyciu metod spektroskopowych i obliczeniowych możliwość istnienia w wodnych i etanolowych roztworach dimerów kardamoniny o strukturze analogicznej do tej obserwowanej w kryształach. Najbardziej wartościowym elementem tej pracy moim zdaniem jest: (a) wyznaczenie nieznanej wcześniej struktury trójwymiarowej kardamoniny w stanie krystalicznym oraz (b) udowodnienie, że w roztworach wodnych kardamonina występuje w postaci dimerycznej, a wraz z zatężaniem ma tendencję do tworzenia agregatów, co najprawdopodobniej przyczynia się do zmniejszania jej rozpuszczalności i tym samym biodostępności. Artykuł stanowi oryginalny i ważny wkład do ogólnej wiedzy na temat rozpuszczalności kryształów związków bioaktywnych, i cząsteczek organicznych w ogólności.

Ponownie, treść artykułu jest w pełni poprawna formalnie i merytorycznie zarówno w mojej ocenie jak i ocenie recenzentów tej publikacji. Nie mam również wątpliwości co do wiodącej roli Doktorantki w przeprowadzeniu tej części badań. Fakt bycia pierwszą autorką artykułu oraz oświadczenia zawarte w artykule świadczą o tym, że mgr Iwona Budziak-Wieczorek miała znaczący wkład w przeprowadzenie eksperymentów, analizę wyników, stawianie wniosków i przygotowanie manuskryptu artykułu, wraz z ilustracjami. Pozostała dwójka autorów, w tym promotor niniejszej rozprawy doktorskiej, jest odpowiedzialna za koncepcję tej pracy oraz stanowiła głównie nadzór merytoryczny i finansowy nad badaniami.

Artykuł nr 3: „Formation of Prenylate Chalcone Xanthohumol Cocrystals: Single Crystal X-ray Diffraction, Vibrational Spectroscopic Study Coupled with Multivariate Analysis” autorstwa Iwony Budziak, Marty Archewskiej (autorka korespondencyjna) i Daniela M. Kamińskiego (autor korespondencyjny), opublikowany w *Molecules* 2020, 24, 4245. W artykule przedstawiono metodę syntezy czterech nowych kokryształów ksantohumolu z nikotynamidem, glutarimidem, acetamidem i kofeiną, podano ich rozpuszczalność w roztworach wodnych oraz scharakteryzowano strukturę trójwymiarową tych kokryształów, w szczególności skupiając się na analizie międzycząsteczkowych wiązań wodorowych w oparciu o badania dyfrakcyjne i spektroskopowe. Analizę spektroskopową pogłębiono poprzez zastosowanie wielowymiarowej analizy składowych głównych (PCA) i

hierarchicznej analizy skupień (HCA) widm w podczerwieni dla kokryształów, fizycznych mieszanin faz krystalicznych ksantohumolu i koformerów, oraz czystych faz ksantohumolu i poszczególnych koformerów.

Artykuł przeszedł pomyślnie recenzję zewnętrznych recenzentów. Ja również nie znajduję żadnych uchybień merytorycznych w tej publikacji. Zgodnie z oświadczeniem zawartym w artykule, mgr Iwona Budziak-Wieczorek wykonała samodzielnie większość eksperymentów (spektroskopia FTIR i Ramana) oraz samodzielnie przeprowadziła analizę wielowymiarową. Uczestniczyła również w przygotowaniu manuskryptu artykułu. Za najważniejsze osiągnięcie mgr Iwona Budziak-Wieczorek w tej pracy uważam (a) uzyskanie kokryształów ksantohumolu, które wykazują się lepszą rozpuszczalnością niż faza krystaliczna czystego ksantohumolu, oraz (b) wykazanie, że wielowymiarowe metody statystyczne zastosowane do widm w podczerwieni są skuteczną metodą do odróżniania faz krystalicznych kokryształów ksantohumolu od fizycznych mieszanin faz stałych czystych komponentów, oraz od fazy stałej czystego ksantohumolu. Osiągnięcia te są bardzo istotne z punktu widzenia klinicznych zastosowań ksantohumolu. Praca jest również bardzo ciekawa z poznawczego punktu widzenia. Przedstawione dane mogą przyczynić się do zrozumienia mechanizmów powstawania kokryształów oraz wpływu ich budowy na rozpuszczalność w roztworach wodnych. I tu nasuwa mi się kolejne pytanie. Czy w przypadku kokryształów ksantohumolu, analogicznie jak w przypadku (-)-epikatechiny, istnieją jakieś proste zależności między rozpuszczalnością a liczbą i siłą oddziaływań ksantohumolu z koformerami lub siłą oddziaływań między cząsteczkami ksantohumolu? Czy na te pytania można by było odpowiedzieć w oparciu widma w podczerwieni w obszarach dotyczących grup funkcyjnych odpowiedzialnych za tworzenie wiązań wodorowych? W przypadku widm w podczerwieni jest dostęp również do widma fazy stałej czystego ksantohumolu co ułatwia tego typu analizę porównawczą.

Artykuł nr 4: „Effect of polyols on the DMPC lipid monolayers and bilayers” autorstwa Iwony Budziak, Marty Arczewskiej, Moniki Sachadyn-Król, Arkadiusza Matwijczuka, Adama Waśko, Mariusza Gagosia, Konrada Terpiłowskiego i Daniela M. Kamińskiego (autor korespondencyjny), opublikowany w BBA – Biomembranes, 2018, 1860, 2166-2174. W artykule przedstawiono wyniki badań kalorymetrycznych i spektroskopowych nad wpływem obecności polioli: erytrytolu, ksylitolu i mannitolu na modelowy układ mono- dwu- i wielowarstw lipidowych zbudowanych z lipidu DMPC. Badania pozwalają stwierdzić, że (a) badane polirole nie oddziałują z częścią hydrofobową lipidów i nie przenikają przez błony lipidowe, oraz (b) badane polirole oddziałują z częścią hydrofilową lipidów tworząc wiązania wodorowe z grupami fosforanowymi, przy czym te wiązania są tym silniejsze im mniejsza cząsteczka polioli, (c) zmniejszają również stopień uwodnienia powierzchni warstwy lipidowej, przy czym wpływ mannitolu jest największy. Te nowe obserwacje sugerują, że stosowanie

polioli najprawdopodobniej nie zwiększy przenikalności związków bioaktywnych przez błony biologiczne i należy poszukiwać innych związków spełniających tę rolę.

Artykuł jest bardzo obszerny, wnioski poparte są wynikami z wielu eksperymentów przeprowadzonych przy użyciu różnorodnych technik, a poprawność przeprowadzenia badań i wnioskowania potwierdzają również zewnętrzni recenzenci tego artykułu. Mgr Iwona Budziak-Wieczorek jest pierwszą autorką tego artykułu, należy więc przyjąć, że jej wkład we wszystkie te badania i wnioskowanie był znaczący. Brakuje jednak stwierdzenia wprost w autoreferacie na temat wkładu Doktorantki w powstanie tego artykułu.

W końcowym rozdziale autoreferatu Doktorantka przedstawia podsumowanie swojej rozprawy doktorskiej i najważniejsze wnioski. Wnioski wymienione w tym rozdziale w dużej mierze pokrywają się z najważniejszymi wnioskami wymienionymi przeze mnie przy omawianiu poszczególnych artykułów naukowych. W podsumowaniu mogę stwierdzić, że Doktorantce udało się spełnić oba założone cele oraz zweryfikować wszystkie postawione tezy badawcze.

Uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska w sposób oryginalny i wartościowy poszerza ogólną wiedzę na temat strukturalnych, fizykochemicznych i spektroskopowych właściwości wybranych naturalnych flawonoidów: (-)-epikatechiny, kardamoniny i ksantohumolu. W szczególności daje wgląd w zależności między budową wewnętrzną fazy stałej tego typu związków i ich kokryształów a rozpuszczalnością w roztworach wodnych. Pozwala również zrozumieć w jaki sposób poliole powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym oddziałują z błonami lipidowymi. Od strony użytkowej wartościowe jest opracowanie syntezy nowych kokryształów ksantohumolu cechujących się lepszą rozpuszczalnością. Nie mam wątpliwości, że badania przedstawione w rozprawie wpłyną na opracowanie nowych technologii umożliwiających zwiększenie biodostępności ważnych związków pochodzenia naturalnego.

Rozprawa napisana jest bardzo starannie, poprawnym językiem, z zastosowaniem wszelkich zasad techniki pisanie prac naukowych. Autoreferat zawiera wszystkie elementy składowe wymagane w Uchwale nr 3.3.II/2019 Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 16 grudnia 2019 r. Rozprawa obarczona jest bardzo małą ilością błędów edytorskich:

- strona 12, wiersz 10 od dołu: w zdaniu „Zielona herbata zawiera 75-80% wody oraz związków polifenolowych (...)” nie podano jaki procent stanowią związki polifenolowe;
- strona 24, wiersz 3 od dołu: jest napisane „występują dwie symetrycznie niezależne cząsteczki EC: A (na czerwono) i B (na zielono), które oddziałują ze sobą (...)”, nie jest tu potrzebny

fragment „: A (na czerwono) i B (na zielono)”, ponieważ w autoreferacie nie umieszczono rysunku na którym zostałyby wykorzystane te oznaczenia i kolory;

- strona 32, wiersz 3 od góry: jest „prawie płaską”, powinno być „prawie płaską”;
- strona 35, wiersz 3 od dołu: zdanie „Wielkość tego efektu jest następująca: mannitol z 6 grupami hydroksylowymi, ksylitol z (...) nie jest zrozumiałe;
- publikacja nr 1, strona 6, tabela nr 3: Czy różnice w energii pomiędzy poszczególnymi dimerami rzeczywiście wyrażone są w jednostkach a.u. a nie w jednostkach kJ/mol?

Dostrzeżone przeze mnie drobne błędy czy nieścisłości nie mają wpływu na wartość naukową pracy.

Doktorantka wykazała się znajomością wielu metod eksperymentalnych powszechnie stosowanych w badaniach fizykochemicznych związków bioaktywnych. Spojrzenie na przedstawione artykuły w sposób chronologiczny pokazuje, że kompetencje Doktorantki poszerzały się w czasie. Nie mam wątpliwości, że obecnie mgr Iwona Budziak-Wieczorek jest już w pełni samodzielną, młodą badaczką, specjalistką w dziedzinie badań fizykochemicznych, w tym spektroskopowych i strukturalnych, związków pochodzenia naturalnego.

Wobec powyższego oceniam bardzo pozytywnie przedstawioną mi rozprawę doktorską. Stwierdzam, że rozprawa spełnia wszelkie warunki określone w stosownej Ustawie i wnioskuję do Rady Instytutu Nauk Chemicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Iwony Budziak-Wieczorek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Paulina Dominiak