



**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE**  
Wydział Farmaceutyczny z Oddz. Analityki Medycznej  
Zakład Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii  
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin

Lublin, 23.05.2017

**Recenzja dysertacji doktorskiej mgr Anny Łągiewki**  
**pt. *Badanie samorzutnych reakcji inwersji chiralnej i peptyzacji wybranych aminokwasów***  
**wykonanej w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach**  
**pod kierunkiem prof. dr hab. Teresy Kowalskiej**

Praca doktorska p. mgr Anny Łągiewki dotyczy optycznie czynnych aminokwasów biogennych, posiadających węgiel asymetryczny, będący centrum chiralnym. Są to wybrane aminokwasy: *L*-Cysteina, *DL*-Cysteina, *L*-Fenylalanina, *D*-Fenylalanina, *L*-Hydroksyprolina, *L*-Metionina i *L*-Fenylglicyna. Badania dotyczą reakcji oscylacyjnych tych związków, w głównej mierze – oscylacyjnej konwersji chiralnej i peptyzacji. Praca doktorska p. mgr Anny Łągiewki jest kolejną dysertacją na temat oscylacyjnej inwersji chiralnej i oscylacyjnej peptyzacji pod promotorstwem prof. Teresy Kowalskiej, która od kilku lat wraz z zespołem zajmuje się badaniem tego zjawiska w roztworach pochodnych kwasów organicznych.

W związku z celem pracy doktorantka w części literaturowej dysertacji omawia aminokwasy: ich nomenklaturę, budowę, punkt izoelektryczny. W tabeli 1 przedstawia aminokwasy białkowe, ich nazwy, wzory, stosowane skróty, masę molową, punkt izoelektryczny oraz główne funkcje pełnione w organizmach żywych.. Omawia także podział aminokwasów wg różnych kryteriów. Następnie autorka omawia peptydy: ogólną charakterystykę, powstawanie, oraz charakter wiązania peptydowego. Kolejny rozdział jest poświęcony rozdzielaniu chromatograficznemu enancjomerów aminokwasów. Rozpoczyna omawianie od zasad rozdzielania enancjomerów i przedstawia technikę chiralnej chromatografii cienkowarstwowej, chiralną wysokosprawną chromatografię cieczową z przedstawieniem chiralnych faz stacjonarnych. Omawia też dodatki chiralne do fazy ruchomej. Następny podrozdział stanowi chiralna chromatografia gazowa a także zasady

rozdziału pośredniego i przykłady chiralnych reagentów stosowanych do derywatywacji enancjomerów w rozdziale pośrednim (w postaci tabeli). Porównuje też metody pośrednią i bezpośrednią. Rozdział 4 części literaturowej poświęcony jest analizie peptydów techniką MS: metody jonizacji peptydów, ustalanie sekwencji aminokwasów w peptydach i białkach.

Osobna część dysertacji jest poświęcona reakcjom oscylacyjnym z uwzględnieniem historii ich odkrycia i modeli je opisujących. Najważniejszy model – Brukselerator jest opisany bardziej szczegółowo. Doktorantka w podrozdziale 5.3 przedstawia kondensację i inwersję chiralną, jako procesy oscylacyjne. W procesach tych zespół p. prof. Teresy Kowalskiej i dr hab. Mieczysława Sajewicza odegrał ogromną – pionierską rolę. Badania zawarte w niniejszej dysertacji wpisują się w tę tematykę.

Ostatni rozdział części literaturowej stanowi omówienie badań nano- i mikrostruktur, w którą organizują się peptydy jak: turbidymetria i skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).

Cel pracy jest ujęty w siedmiu podpunktach i dotyczy badania aminokwasów biogennych, które są optycznie czynne, pod kątem ich zdolności do oscylacyjnej konwersji chiralnej w środowisku abiotycznym oraz badania ich samorzutnej kondensacji. Te cele doktorantka realizowała stosując chromatografię cienkwarstwową na cienkich warstwach celulozy z derywatywacją ninhydriną jak również z detekcją MS. Stosowano także wysokosprawną chromatografię w układach RP-18 z użyciem eluentów wodno-metanolowych i detektora ELSD. Ponadto doktorantka stosowała chromatografię sprzężoną z spektrometrią mas oraz spektrometrię mas. Oprócz technik chromatograficznych zastosowane zostały skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), polarymetria, turbidymetria oraz test biuretowy.

Badaniom zostały poddane wymienione powyżej aminokwasy w układach jedno- i dwuskładnikowych. I tak przeprowadzono badania zachowania jednoskładnikowych roztworów aminokwasów: *L*-Metioniny, *L*-Cysteiny, *L*-Fenylalaniny oraz dwuskładnikowych roztworów aminokwasów: *L*-Fenylalaniny i *L*-Hydroksyproliny, *L*-Cysteiny i Fenylalaniny oraz *L*-Cysteiny i *L*-Fenylglicyny.

Za pomocą metody TLC z densytometrią i TLC-MS stwierdzono obecność trzech plamek (pików) na chromatogramie po wywołaniu ninhydriną, a mianowicie – głównego pikę *L*-Metioniny, ale również dwu mniej intensywnych odpowiadających *D*-Metioninie oraz frakcji peptydowej. Pasma *D*-Metioniny zanikało, a pasmo frakcji peptydowej intensyfikowało się w czasie 5 godzin przechowywania roztworu. Zjawiska te zostały potwierdzone po 5-ciu miesiącach przechowywania roztworu wzorca *L*-Met, gdzie ponownie

stwierdzono obecność plamki *D*-Met, co pozwala na przypuszczenie o nieliniowej inwersji chiralnej w roztworze. Przypuszczenia potwierdzają widma mas uzyskane za pomocą TLC-MS, które, pomimo, że zawierają szumy, to wyraźnie widać w nich piki odpowiadające monomerom, a dla plamki żółtej – peptydom. W przypadku *L*-Met te wstępne obserwacje były weryfikowane badaniami polarymetrycznymi. Stwierdzono zmiany skręcalności właściwej w ciągu 10 dni od -5 do -9 i fakt, że zmiany te są oscylacyjne. W drugim eksperymencie zmiany rejestrowano w czasie 4 godzin w trybie ciągłym co 1 s i stwierdzono zmiany wartości skręcalności właściwej od około -8 do -7 z trendem w kierunku wzrostu wartości czyli racemizacji roztworu. Technika HPLC w układach achiralnych z detekcją ELSD i MS pozwoliła na potwierdzenie oscylacyjnej kondensacji w roztworze *L*-Met. Widać to poprzez analizę zmian wysokości maksimum pików odpowiadających monomerowi w czasie kilkudziesięciu godzin. Rzeczywiście po ok. 12 h i po 53 h pojawiają się bardzo wyraźne piki o niższym i wyższym czasie retencji niż monomer, które po dalszym przechowywaniu roztworu zanikają. Widmo masowe potwierdza obecność w widmie pików peptydowych. Dodatkowym dowodem na kondensację *L*-Met jest pozytywny test biuretowy pojawiający się po 10 dniach przechowywania roztworu. Także analiza mikrografii z mikroskopu elektronowego SEM ukazuje struktury peptydowe w próbkach po 5-miesięcznym przechowywaniu w wodnym roztworze *L*-Met.

Podobne wnioski wypływają z analizy jednoskładnikowych roztworów *L*-Cysteiny. Także i w tym przypadku na chromatogramie cienkowsarstwowym obecne są trzy plamki. Tym razem doktorantka wnioskuje, że najbardziej intensywny pik pochodzi od frakcji peptydowej, który jest obecny w świeżo przygotowanym roztworze a także po kilku godzinach i kilkudziesięciu dniach przechowywania roztworu oraz w roztworze racematu *DL*-Cysteiny. Na chromatogramach są też widoczne plamki odpowiadające drugiej frakcji peptydowej. To właśnie pasmo zostało zweryfikowane za pomocą TLC-MS i potwierdzono, że *L*-Cys i *DL*-Cys ulegają procesowi spontanicznej kondensacji, co potwierdzają widma MS. Także i w tym przypadku obserwowano zachowanie retencyjne *L*-Cysteiny w ciągu kilku godzin jej przechowywania w roztworze i zaobserwowano zmniejszenie piku odpowiadającego monomerowi w związku z szybką kondensacją aminokwasu. Także i w tym przypadku technika HPLC w układach achiralnych z detekcją ELSD i MS pozwoliła na potwierdzenie oscylacyjnej kondensacji w roztworze *L*-Cys. Potwierdza to samo prześledzenie zmian kształtu profili chromatograficznych dla *L*-Cys przechowywanej w 70% acetonitrylu po upływie ok. 2, ok 11, ok. 13 i 73 godzin, a także analiza zmian wysokości maksimum pików w czasie ok. 100 h i analiza widm masowych, zmieniających się w czasie,

gdzie po 4 dniach przechowywania pojawiają się piki odpowiadające peptydom. W tym przypadku także mikrografie SEM pozwalają na dostrzeżenie nano- i mikrosfer peptydowych.. Dodatkowo wykonano badania turbidymetryczne analizując stopień zmętnienia roztworów *DL*-Cys w 70% roztworze acetonitrylu, które w tym przypadku są niewielkie, natomiast są wyraźne w analogicznym roztworze *L*-Cys w ciągu 4 dni, które oscylują w przedziale 38,5-43 NTU i zmętnienia zmieniają się cyklicznie.

Badaniom poddano także metanolowo-wodny (70%) roztwór *L*-Fenylalaniny, *D*-Fenylalaniny i *DL*-Fenylalaniny, stosując RP-HPLC. Stwierdzono zmiany wysokości pików w czasie 49 godzinnego przechowywania roztworów, co dowodzi niestabilności strukturalnej i powstawania peptydów, a amplituda zmian jest wyższa dla enancjomerów i zachodzą one początkowo w innych poziomach dla enancjomerów *D* i *L*. Wyniki oscylacyjnej kondensacji potwierdzają wyniki obserwacji zmętnienia roztworów w czasie kilkunastu dni, podobnie wyraźne szczególnie dla enancjomerów.

Badania procesów oscylacyjnych prowadzono także w roztworach zawierających dwa aminokwasy. Na chromatogramach pojawiają się dwa piki od poszczególnych substancji – Fenylalaniny, Hydroksyproliny i produktu kondensacji. Wysokości pików zmieniają się w czasie przechowywania roztworu i zmieniają się także ich czasy retencji. Gdy intensywność sygnałów aminokwasów *L*-Phe i *L*-Hyp wzrastała, malał pik produktu kondensacji. Świadczy to o tym, że produkt jest heteropeptydem. Zarejestrowany spektrochromatogram wykazuje maksimum absorpcji w charakterystycznym dla wiązań peptydowych regionie. Powstanie heteropeptydu potwierdza eksperyment TLC-MS. W świeżo przygotowanym roztworze obecne są substancje o pikach pseudomolekularnych, natomiast w roztworze przechowywanym przez 26 dni prócz tych, lecz o zmniejszonej intensywności na widmie MS są też piki pochodzące od homo i hetero peptydów.

Powstawanie peptydów prześledzono analizując mikro i nanostruktury homo- i heteropeptydów Cysteiny i Fenylglicyny oraz Fenylalaniny. Ponieważ struktury peptydów Cys są kuliste zaś Phe włókniste interesujące było prześledzenie jaką strukturę będą miały heteropeptydy złożone z dwu aminokwasów, w tym Cysteiny. W tym celu wykorzystano technikę SEM i obserwowano struktury utworzonych peptydów. Struktury peptydowe widoczne gołym okiem pojawiały się w roztworach pojedynczych aminokwasów po różnym czasie, dla *L*-Cys po dwu tygodniach, dla *L*-Phe po trzech miesiącach, dla *L*-Phg po jednym miesiącu przechowywania w roztworach. Cys daje strukturę kulistą, Phe tworzy mikrowłókna peptydowe, zaś Phg wielopłaszczyznową strukturę. Natomiast dla układów dwuskładnikowych zawsze z obecnością Cys stwierdzono, że struktury peptydowe powstają

już po dwu tygodniach i Cys determinuje kształt, który staje się kulisty, lecz kule zbudowane są z nieregularnych płatków.

Roztwory *L*-Cys - *L*-Phe badano metodą HPLC z detekcją DAD i ELSD po kilkudziesięciu godzinach przechowywania. Widać na chromatogramach piki odpowiadające obu aminokwasom i kwasowi cysteinowemu. Przy zastosowaniu detekcji DAD zaobserwowano liczne pasma absorpcji w regionie charakterystycznym dla wiązań peptydowych a także disulfidowych. Stwierdzono także zmiany wysokości pików chromatograficznych w czasie przetrzymywania próbki, świadczące o powstaniu struktur peptydowych, odmienne, niż w przypadku roztworów pojedynczych aminokwasów.

Roztwory *L*-Cys - *L*-Phg badano techniką HPLC z detekcją ELSD. Po krótkim czasie przechowywania otrzymano dwa piki aminokwasów i niewielki pik kwasu cysteinowego. Po ok. 200 godzinach przechowywania widoczny jest jeden pik – produktu peptyzacji. Stwierdzono również i w tym przypadku zmiany wysokości pików chromatograficznych w czasie 30 h przetrzymywania próbki, świadczące o powstaniu struktur peptydowych, odmienne, niż w przypadku roztworów pojedynczych aminokwasów. Weryfikację wniosków z tego faktu płynących prowadzono z wykorzystaniem spektrometru mas, która potwierdziła, że w wyniku przechowywania roztworów aminokwasów powstają homo- i hetero peptydy wyjściowych aminokwasów i dominację cysteiny w ich tworzeniu.

Badania turbidymetryczne śledzące zmętnienie roztworów par aminokwasów *L*-Cys - *L*-Phe i *L*-Cys - *L*-Phg, które charakteryzuje odmienna dynamika zmętnienia – w innym przedziale i na różnych poziomach, jednak w obu przypadkach te pomiary świadczą o peptyzacji. Peptyzację potwierdza także test biuretowy – pozytywny dla obu mieszanin.

Zespół we współpracy z prof. Irvingiem R. Epsteinem z USA opracował teoretyczny model samorzutnej kondensacji aminokwasów białkowych, który również jest przytoczony w dysertacji.

Całość omówienia wyników kończą wnioski, podsumowujące uzyskane wyniki.

Dysertacja p. mgr Anny Łagiewki zawiera 70 rysunków, 13 Tabel i kilka schematów reakcji, oparta jest na 186 pozycjach literatury pochodzącej z czasopism o światowym obiegu z ostatnich lat. Natomiast podkreślić należy, że wyniki badań są w przeważającej części opublikowane w dziewięciu publikacjach w czasopismach z listy filadelfijskiej takich jak: *Journal of Liquid Chromatography*, *Journal of Chromatographic Science* (3 publikacje), *Journal of Planar Chromatography*, *Israel Journal of Chemistry*, *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, *Acta Chromatographica*. Ponadto doktorantka jest autorką 4 innych publikacji o tematyce niezwiązanej z dysertacją i licznych publikacji konferencyjnych.

Praca napisana jest klarownie, prawidłowo stylistycznie, co powoduje, że czyta się ją dobrze, chociaż tematyka poruszana przez autorkę jest trudna. Doktorantka uniknęła też literówek i błędów edytorskich w większości przypadków.

Mam kilka pytań do doktorantki, a mianowicie:

Dlaczego Doktorantka zastosowała różne powiększenia przy porównaniu mikrografii ze świeżo sporządzonego roztworu Met i po 5 miesiącach jego przechowywania, co utrudnia a nawet uniemożliwia ich porównanie.

Na jakiej podstawie zidentyfikowano środkowe, najbardziej intensywne pasmo dla Cysteiny jako peptyd, zwłaszcza, że na następnych stronach przytoczone są jedynie widma dla plamki o wyższym  $R_f$ , a tożsamość tego właśnie pasma nie jest potwierdzona.

Dlaczego, choć opisane w części teoretycznej, nie były zastosowane układy chiralne HPLC.

Z obowiązku recenzenta przytaczam też kilka zauważonych niedokładności i usterek. Według nowej nomenklatury powinno się stosować nazw: dikarboksyłowe zamiast dwukarboksyłowe oraz diamino-monokarboksyłowe zamiast dwuamino-monokarboksyłowe (strona 17).

Szczep bakterii to *Bacillus macerans* a nie *Bacillu macerans* – str 26

Str. 37 – dwukrotnie użyto wyrażenia cząsteczka protonu, wystarczy proton, jeden proton...

Błędy literowe:

|        |             |                    |                    |                     |
|--------|-------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Str 11 | <b>jest</b> | znaczą             | <b>powinno być</b> | znaczną             |
| Str 17 | <b>jest</b> | z grupą indolowi   | <b>powinno być</b> | z grupą indolową    |
| Str 28 | <b>jest</b> | krzemionkowy       | <b>powinno być</b> | krzemionkowym       |
| Str 36 | <b>jest</b> | matryce            | <b>powinno być</b> | matrycę             |
| Str 41 | <b>jest</b> | ogniwo             | <b>powinno być</b> | ogniwo              |
| Str 63 | <b>jest</b> | azotanu (V) cynku  | <b>powinno być</b> | azotan (V) cynku 2x |
|        | <b>jest</b> | octanu miedzi (II) | <b>powinno być</b> | octan miedzi (II)   |
| Str70  | <b>jest</b> | mikrobiologicznych | <b>powinno być</b> | mikrobiologicznym   |

Oczywiście usterki te i pewne otwarte kwestie, do których mam nadzieję p. mgr Anna Łągiewka ustosunkuje się na obronie doktorskiej, nie umniejszają wartości pracy, która całkowicie odpowiada wymogom stawianym dysertacjom doktorskim. Wnioskuje zatem do

wysokiej Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie p. mgr Anny Łągiewki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos

Lublin, 2017-05-16

K I E R O W N I K  
Zakładu Chemii Nieorganicznej UM w Lublinie  
  
Prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos