



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Prof. dr hab. Marek Orlik
Pracownia Elektroanalizy
i Elektrokatalizy Chemicznej

Warszawa, 20 maja 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Fulczyk:

„Badanie wpływu ciężkiej wody na reakcje samorzutnej peptyzacji wybranych α -aminokwasów o znaczeniu biologicznym”

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk została przygotowana w Instytucie Chemii Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod promotorską opieką Pana dr. hab. Mieczysława Sajewicza, prof. UŚ. Tematyka pracy jest związana z prowadzonymi wcześniej w tym Zespole, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Teresy Kowalskiej, niemonotonicznych zmian parametrów charakteryzujących różne optycznie czynne substancje w roztworach. W dynamice tych przemian można było zaobserwować pewną periodyczność, nasuwającą skojarzenia z chemicznymi reakcjami oscylacyjnymi.

Na łączną liczbę 109 stron składają się 54 strony części literaturowej, a zatem praca w połowie poświęcona jest opisowi badań własnych, co stanowi rozsądną proporcję między zasadniczymi dwiema częściami rozprawy o tradycyjnej konstrukcji. W części literaturowej spis publikacji został przypisany do poszczególnych podrozdziałów i łącznie liczy 52 pozycje. Z kolei część dotycząca badań własnych opatrzona jest 36 pozycjami literaturowymi. W przekazanym mi, oprawionym egzemplarzu rozprawy zawarte są także wydruki 6 oryginalnych wieloautorskich publikacji w międzynarodowym czasopiśmie *Reaction Kinetics, Mechanism and Catalysis* (IF = 2,081), jednym z nielicznych obecnie czasopism specjalizujących się ściśle w problematyce kinetyki chemicznej oraz 1 praca o charakterze auto-przeglądu, opublikowana w wydawnictwie *Frontiers in Chemistry* (IF = 3,994).. Należy zaznaczyć, że we wszystkich tych pracach Doktorantka jest ich pierwszą współautorką. W dorobku Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk znajdują się również 4 wieloautorskie publikacje w specjalistycznych czasopismach dotyczących chromatografii: 3 prace w *Journal of Chromatography A* (IF = 4,759) oraz 1 w *Journal of Chromatographic Science* (IF = 1,681), merytorycznie niezwiązane z tematyką rozprawy doktorskiej. Oznacza to, iż pełny dorobek naukowy Doktorantki obejmuje współautorstwo 11 publikacji w cenionych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej.



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Tematyka pracy odnosi się do dynamiki samorzutnej kondensacji wybranych α -aminokwasów, która przebiega poprzez proste struktury peptydowe aż po samoorganizację w różnego typu nano- i mikrostruktury, które przynajmniej częściowo opuszczają homogeniczną fazę roztworu i ulegają wytrąceniu w postaci fazy stałej, możliwej do badania stosownymi metodami. W przebiegu procesów peptyzacji Autorka rozprawy, wraz ze współautorami odnośnych publikacji, dostrzega ich niemonotoniczność i można sądzić, że tym samym postuluje ich interpretację w kategoriach mechanizmu analogicznego do chemicznych reakcji oscylacyjnych. Z tego powodu część literaturowa rozprawy zawiera, obok rozdziału 1, charakteryzującego badane aminokwasy – cysteinę, metioninę, prolinę, hydroksyprolinę, alaninę i histydynę, także rozdział 2, w całości poświęcony zwięzłej charakterystyce reakcji oscylacyjnych, której poświęcę teraz więcej uwagi i komentarzy.

Na s. 23, w ogólnej charakterystyce procesów oscylacyjnych pada kontrowersyjne stwierdzenie, iż „reakcje oscylacyjne [...] wstępnie wydają się chaotyczne, jednak cechują się uporządkowaniem”, podczas gdy reakcje te często charakteryzują wręcz uderzającą periodycznością. Powyższe zdanie bardziej odpowiada istocie chaosu deterministycznego, czyli „chaosu z ukrytym porządkiem”, który występuje tylko w pewnych warunkach. Byłbym też ostrożny ze stwierdzeniem, że w trakcie homogenicznej reakcji oscylacyjnej „można zaobserwować spadek, a następnie wzrost stężenia zarówno substratów, produktów oraz produktów przejściowych”, czemu zresztą przeczą wykresy na rys. 9, wskazujące oscylacyjne zmiany tylko produktów pośrednich, których taka dynamika przede wszystkim w układach homogenicznych dotyczy.

Wydaje się, że naturalną kontynuacją wstępnych rozważań ze s. 23 powinny być homogeniczne reakcje oscylacyjne, jednak Autorka decyduje się w pierwszej kolejności na opisanie układów heterogenicznych, w tym rtęciowego i galowego „serca”. W opisie serca rtęciowego brakuje mi podania od razu prostego, przekonującego mechanizmu powtarzających się pulsacji, który pojawia się dopiero później, w opisie działania galowego serca. W opisanym klasycznej wersji eksperymentu z sercem rtęciowym, z użyciem zakwaszonego przez H_2SO_4 roztworem utleniacza takiego, jak KMnO_4 lub $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, istota mechanizmu polega na powierzchniowym utlenieniu rtęci do Hg_2^{2+} . Adsorpcja jonów Hg_2^{2+} na powierzchni rtęci, rekonstruuje warstwę podwójną na granicy faz, powoduje dodatnie względem roztworu naładowanie powierzchni Hg. Czynnikiem ten, a dodatkowo także tworzenie powierzchniowego filmu Hg_2SO_4 , widocznego gołym okiem, powoduje obniżenie napięcia międzyfazowego na granicy faz: rtęć/roztwór elektrolitu. Kropla Hg rozpląszcza się i powinna wtedy dotknąć *bocznie ustawionego* drucika żelaznego. W układzie tak zwartych elektrod Fe działa jako reduktor jonów Hg_2^{2+} , a zatem także destruktor filmu Hg_2SO_4 , dzięki czemu napięcie międzyfazowe rośnie, a wyprężająca się w konsekwencji kropla rtęci traci boczny kontakt z drutem żelaznym, stając się ponownie fazą podatną na powierzchniowe utlenianie, np. przez jony MnO_4^- i sytuacja cyklicznie się powtarza. Cały proces chemiczny sprowadza się do



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



utleniania żelaza przez jony MnO_4^- za pomocą rtęci (czy też układu redoks $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$) jako mediatora, który zachowuje się przy tym atrakcyjnie od strony wizualnej. Podane w rozprawie na stronie 25 reakcje (1) i (2) dotyczą analogicznej sytuacji z innym utleniaczem: H_2O_2 , choć nie wskazuje się tam możliwej roli Hg_2SO_4 , skupiając się na depolaryzacji elektrod Hg i Fe w kontakcie z roztworem $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4$, po ich zwarceniu. Trzeba jednak przyznać, że w pracach różnych autorów można zauważyć pewne rozbieżności dotyczące chemicznych szczegółów mechanizmów działania układów typu rtęciowego serca. Dla ścisłości muszę jednak nadmienić, że w cytowanej przez Doktorantkę pracy [8] opisane są głównie *zasadniczo inne* warianty realizacji rtęciowego serca, w których ma miejsce zewnętrzna polaryzacja elektrod, dochodząca nawet do kilkunastu woltów, czyli są to konstrukcje wymagające zasilania przez zewnętrzne źródło napięcia.

Rozdział 2.2 poświęcony jest opisowi dwóch znanych homogenicznych procesów oscylacyjnych: reakcji Braya-Liebhaufsky'ego (BL) i Biełousowa-Żabotyńskiego (BŻ), co na tym etapie lektury może sugerować, iż analiza oscylacyjnych mechanizmów reakcji będzie także w dalszej części pracy istotnym elementem interpretacji własnych badań. W przypadku reakcji BL podanych jest aż 7 modelowych mechanizmów tego procesu, w postaci równań etapów reakcji, bez przypisanych im stałym szybkości, które mają istotne znaczenie, bo zachowanie oscylacyjne to również kwestia braku zbilansowania między szybkościami tworzenia i destrukcji form przejściowych. Z kolei dla reakcji BŻ podane zostały dwie propozycje: Györgyi'ego i in. oraz Försterlinga i in., złożone odpowiednio z 17 i 16 etapów. Mam jednak wrażenie, że czytelnik, który nie jest wprowadzony w istotę chemicznych procesów oscylacyjnych, w przedstawionych mechanizmach dostrzeżby jedynie ich, prawdopodobnie zagadkową na tym etapie, złożoność, a miałby problem z określeniem zasadniczego, niejako uniwersalnego, szkieletowego źródła chemicznych oscylacji. Sądzę więc, że byłoby pożyteczne wskazanie, że oscylacyjny przebieg reakcji chemicznych wynika zawsze z gry między dodatnimi i ujemnymi pętlami sprzężeń zwrotnych. Tworzenie pewnej substancji (formy przejściowej) w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego jest z pewnym opóźnieniem hamowane przez ujemne sprzężenie zwrotne dokonujące się za pomocą tworzącej się odpowiedniej, innej formy przejściowej. Niezależnie od tej ogólnej konstrukcji oczywiście warto w mechanizmie konkretnej reakcji oscylacyjnej wskazać jej kluczowe chemiczne elementy. W odniesieniu do reakcji (83 – 86), stanowiących fragment typowych mechanizmów reakcji BŻ, pożyteczne więc byłoby dokładniejsze wskazanie takiej kluczowej roli jonów bromkowych. Pod tym względem przejrzyste wyjaśnienie oferuje mechanizm FKN, a jeszcze bardziej czytelna jest jego modelowa wersja - Oregonator, który jednak nie został omówiony w rozprawie. Oregonator wyraźnie dzieli reakcje w układzie BŻ na 3 grupy: A, B, C, z których pierwsza wymaga konsumpcji jonów bromkowych, druga dominuje, gdy stężenie tych jonów staje się bardzo małe; wtedy Ce(III) jest utleniany do Ce(IV) i autokatalitycznie powstaje HBrO_2 . Co ważne, w stosunkowo powolnym procesie C, gdy jony Ce(IV) utleniają kwas



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



bromomalonowy, odtwarzają się jony Br^- i procesy grupy A zaczynają znów dominować, stopniowo zużywając jony Br^- itd. Taki mechanizm oscylacji nie wynika jednoznacznie z sumarycznych równań (83-86) podanych w rozprawie, a nawet pojawia się mylące sformułowanie, iż „proces pierwszy przebiega przy odpowiednio wysokim, granicznym stężeniu jonów bromianowych [...], generowanych w etapie drugim”. W żadnym z powyższych etapów nie są generowane jony bromianowe(V), które są substratem, obecnym zresztą w znacznym nadmiarze. Z pewnością w zdaniu tym powinna być mowa o jonach **bromkowych**.

Pewnego uściślającego komentarza wymaga też zawarta dalej na s. 33 informacja, iż do reakcji BŻ, katalizowanej solami ceru, można dodać ferroiny, aby uzyskać nałożenie barw: żółtej i niebieskiej, w celu otrzymania zielonej. Istotnie można tak postąpić, lecz ferroina może być także samodzielnym katalizatorem reakcji BŻ, wywołując periodyczne przejścia między ciemnoczerwoną i niebieską barwą roztworu. Jestem pewien, że pokazane na rys. 12 koncentryczne fale chemiczne, zostały otrzymane właśnie z użyciem ferroiny jako jedynego katalizatora, a gdyby obrazy były kolorowe, miałyby postać niebieskich kręgów na ciemnoczerwonym tle. Ciekawym neologizmem jest termin „proces autofalowy”, będący zapewne dosłownym przełożeniem anglojęzycznego pojęcia „autowave process” jako rozszerzenia na zjawiska czasowo-przestrzenne terminu „autooscillations”, oznaczającego spontaniczne oscylacje. Niektóre anglojęzyczne pojęcia z zakresu dynamiki nieliniowej nie mają jeszcze oficjalnego polskojęzycznego odpowiednika, więc Doktorantka formułuje w tym przypadku pionierską propozycję.

Omówiona w rozdziale 3.3 reakcja Briggsa-Rauschera, którą można uważać za chemicznie połączone reakcje BL i BŻ, została zilustrowana mechanizmem zweryfikowanym przez Edelsona za pomocą *sensitivity analysis*, w postaci Tabeli na s. 37, zaczerpniętej z oryginalnej publikacji [28]. Byłoby pożyteczne, a nawet eleganckie przełożenie legend tej Tabeli na język polski, połączone w szczególności z wyjaśnieniem takich pojęć, jak „*static mechanism*”, „*CSTR mechanism*” oraz „*static MMA mechanism*”. Na marginesie, warto wiedzieć, że skrobia tworzy niebieski kompleks nie z samym elementarnym jodem, lecz z jonami poliodkowych I_n^- .

W rozdziale 2.3 Autorka zwięźle opisuje tematykę wcześniejszych badań swojego Zespołu, kierowanego przez Panią Prof. Teresę Kowalską, przypominając niemonotoniczne (quasi-oscylacyjne) niestabilności w charakterystyce czasowej niskomolekularnych kwasów karboksylowych, ujawnione w pomiarach wykonywanych metodą chromatografii cienkowarstwowej i interpretowane jako samorzutna inwersja chiralna, dotycząca np. S-ibuprofenu. W kolejnym rozdziale (2.4) rozważania te są kontynuowane na podstawie badań wykonanych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odniesieniu do kwasu L-mlekowego, którego długoczasowa oligomeryzacja przebiegała w sposób niemonotoniczny, quasi-oscylacyjny. Istotnym elementem tej dynamiki jest potwierdzenie periodycznego wkładu do tego procesu, uchwyconego po zastosowaniu transformacji Fouriera do oryginalnego



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



szeregu czasowego. Zaproponowany prosty, 4-etapowy model tego procesu zawiera etap autokatalityczny, a konkretnie autokatalizowaną agregację miceli oligomeru, co podkreśla wspomnianą przeze mnie wyżej rolę sprzężeń zwrotnych w procesach oscylacyjnych. Z kolei dla peptyzacji układu 2 aminokwasów: L-proliny i L-feniloalaniny w roztworze wodno-acetonitrylowym zaobserwowano powstawanie nierozpuszczalnych nano- i mikrostruktur, co także ma pewne znaczenie dla opisanych dalej przez Doktorantkę wyników badań własnych. Dla zrozumienia dynamiki oscylacyjnej z udziałem takich procesów został także w przeszłości opracowany i opublikowany odpowiednio rozszerzony model, w którym tworzeniu i roztwarzaniu nanowłókien przypisane zostały odpowiednio dobrane stałe szybkości tych procesów. Należy więc podkreślić, że w części literaturowej wymienione są 2 modelowe mechanizmy oscylacyjne i można było oczekiwać, że zostaną one wykorzystane lub zmodyfikowane w celu interpretacji wyników badań bieżących.

Ostatni rozdział części literaturowej (3.1) poświęcony jest opisowi ciężkiej wody (D_2O), z uwzględnieniem metod jej otrzymywania i wpływu na różne organizmy. Dziwi mnie to, że w kontekście własnych badań Doktorantki nie został w tym miejscu opisany żaden proponowany w literaturze mechanizm wpływu D_2O na dynamikę chemicznych reakcji oscylacyjnych (np. dla reakcji BŻ i BR, o czym traktują m. in. publikacje Stanisavljeva i in. oraz Rossiego i in. wymienione jako pozycje [32 – 35] w pierwszej z załączonych publikacji, a zatem są to opracowania, które powinny być Doktorantce znane. Nawiasem mówiąc – dane bibliograficzne dla odnośnika [32] zawierają błąd.

Rozpoczynający się od strony 55. opis **własnych badań** Doktorantki zawiera w pierwszej kolejności sprecyzowanie celów pracy, sprowadzających się do: 1) badania technikami wysokosprawnej chromatografii cieczowej przebiegu samorzutnej peptyzacji wybranych α -aminokwasów w środowiskach wodno-organicznych, ze szczególnym uwzględnieniem niemonotoniczności tego procesu, określanego jako oscylacyjny oraz 2) wpływu ciężkiej wody (D_2O) na samorzutną kondensację wybranych α -aminokwasów, z użyciem spektrometrii mas, mikroskopii elektronowej i turbidymetrii w celu analizy produktów reakcji. Może zatem odnieść wrażenie, że założonym celem badań nie było wyjaśnienie mechanizmu obserwowanych zjawisk poprzez opracowanie ich mechanizmów, lecz jedynie określenie przejściowych i finalnych produktów, z uwzględnieniem mikroskopowej morfologii tworzących się faz stałych, czyli głównie zebranie faktów doświadczalnych.

Na s. 56-57 podany jest zestaw stosowanych odczynników, przy czym należy odnotować błąd we wzorze strukturalnym L-histydyny, której cząsteczka powinna zawierać 5-członowy, a nie 6-członowy pierścień heterocykliczny. Na kolejnych stronach opisany jest proces przygotowywania próbek oraz metodyka badań poszczególnymi, w/w metodami.

Opis eksperymentów Doktorantki rozpoczyna się na s. 64, od przedstawienia przemian aminokwasów w roztworach o specjalnym, ze względu na długi czas obserwacji, działaniu



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



antyseptycznym: 70% (objętościowych) głównie metanolu lub (w niektórych przypadkach) acetonitrylu + 30% wody (H_2O). Badania techniką HPLC-ELSD miały za cel określanie ilości monomerycznego, wyjściowego enancjomeru. Rys. 20 dla L-cysteiny nie pozostawia wątpliwości co do niemonotonicznego charakteru zmian chromatograficznego sygnału. Dla L-metioniny (rys. 22) niemonotoniczny przebieg sygnału HPLC, generuje widmo mocy, złożone z wielu pików, sugerujących wiele składowych harmonicznych, które mogłyby złożyć się na (zapewne raczej niefizyczny) przebieg periodyczny. Widmo dla L-proliny, moim zdaniem, nie jest łatwe do interpretacji. Dla L-hydroksyproliny, mimo ewidentnie niemonotonicznego przebiegu sygnału chromatograficznego w czasie, widmo mocy ukazuje tylko stały w czasie składnik wraz z szeregiem niskoamplitudowych sygnałów, wśród których trudno jest znaleźć silny wkład o częstości podstawowej. Co ciekawe, roztwory tych aminokwasów w czystym D_2O nie wykazywały takiej dynamiki (piki chromatograficzne zachowywały stałą wysokość sygnału w czasie), ale trudno te dwie grupy eksperymentu precyzyjnie porównywać, skoro w jednej z nich stosowano roztwory zawierające 30% wody, a w drugiej – była to praktycznie 100% D_2O . Tym niemniej hamujące całkowicie dynamikę przemian aminokwasów środowisko 100% D_2O nie ulega wątpliwości.

Od s. 71 rozpoczyna się opis badań peptyzacji L-alaniny metodą HPLC-DAD. W zasadzie nawet bez stosowania transformacji Fouriera widoczne są tylko dwie początkowe, stosunkowo wysokoamplitudowe oscylacje sygnału (w założeniu proporcjonalnego do stężenia monomerycznej L-alaniny), po czym następuje dryf do stanu quasistacjonarnego o pośrednim stężeniu L-Ala. L-His również nie wykazała zdecydowanie niemonotonicznych zmian w czasie, lecz praktycznie monotoniczny spadek stężenia. I znów w obu przypadkach użycie 100% D_2O jako środowiska reakcji wyhamowało zmiany stężenia substratu.

Kolejna część badań, opisana w rozdziałach 3-5 (s. 75 – 105) dotyczy wpływu ciężkiej wody na reakcje kondensacji α -aminokwasów, przy czym tym razem nie była śledzona dynamika tych procesów, lecz analizowany był końcowy (po upływie 7 dni) skład układu. Zastosowane metody obejmowały spektrometrię mas dla uchwycenia monomerycznych aminokwasów i różnych rozpuszczalnych peptydowych produktów, skaningową mikroskopię elektronową dla ujawnienia morfologii wytrącających się faz stałych oraz turbidymetrię dla oceny optycznych właściwości próbek, w których zachodziła kondensacja.

W opisie wyników badań należy odróżniać czystą D_2O jako środowisko reakcji od mieszanin niewodnego rozpuszczalnika z D_2O o zawartości nieprzekraczającej 30% obj. Dla L-cysteiny zaobserwowano w widmie MS wzrost liczby i intensywności pików ze wzrostem stężenia D_2O , co wobec praktycznie pojedynczego piku dla 100% D_2O sugeruje przejście stopnia złożoności produktów kondensacji przez maksimum. Dla L-Met bogactwo pików charakteryzowało także układy o umiarkowanej zawartości D_2O , w porównaniu z czystą D_2O jako środowiskiem reakcji. Porównanie z opisaną dalej L-proliną, dla której stopień złożoności widm ze wzrostem $[D_2O]$ przechodzi przez minimum, jest utrudnione ze względu na inny



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



zastosowany rozpuszczalnik niewodny w mieszaninie: metanol, podczas gdy w poprzednich przypadkach był to acetonitryl. Dla L-Hyp w mieszaninach z metanolem można było z kolei zaobserwować pewne wyhamowania procesu peptyzacji ze wzrostem $[D_2O]$. Również dla L-Ala dodatek D_2O (w środowisku wodno-metanolowym) obniżał natężenia sygnałów w widmach MS, w porównaniu z roztworem zawierającym tylko 30% H_2O . W zasadzie podobny co do tendencji wniosek można wysnuć z badań MS dla wodno-metanolowych układów z L-histydyną. Oczywiście wyniki takie wymagają uważnej interpretacji i w podsumowaniu zawartym na s. 88 słusznie zwraca się uwagę na to, że wyniki dla L-Cys i L-Met nie powinny być interpretowane pochopnie jako sprzyjanie peptyzacji tych aminokwasów przez obecność D_2O , ponieważ widma masowe ujawniają skład jedynie rozpuszczalnych peptydów, pomijając skład wytrącającej się wcześniej fazy stałej. Dlatego generalnym wnioskiem na tym etapie badań jest uznanie, że dodatek D_2O wpływa hamująco na peptyzację, zgodnie zresztą z obserwacją poczynioną dla czystej D_2O . W przypadku pozostałych aminokwasów (badanych jednak w innym środowisku) wpływ ten jest bardziej złożony, ujawniając zestawione na rys. 38 trzy generalne tendencje: monotoniczny wzrost (L-Cys), przejście przez maksimum (L-Pro) i niewielkie monotoniczne obniżenie (L-Ala) stopnia złożoności widm MS. Należy jednak jeszcze raz podkreślić fragmentaryczny obraz peptyzacji jako dotyczący jedynie rozpuszczalnych peptydów.

Z tego powodu opisane w p. 3.2 mikroskopowe obrazy wytrąconych faz stałych (mikro- i nanostruktur), pokazane na s. 92 – 98, mogłyby mieć komplementarny charakter do wyników opisanych metodą spektrometrii mas. Jednak jest to trudne, ponieważ:

- (1) próbki do badań MS analizowane były po 7 dniach, a fazy krystaliczne pochodziły z układów przechowywanych aż przez miesiąc, poddawanych następnie odparowaniu do sucha
- (2) faza stała zawierała zarówno nierozpuszczalne peptydy o względnie wysokiej masie cząsteczkowej, jak też rozpuszczalne o niższym stopniu agregacji.

Zastanawiam się więc, czy nie byłoby *także* celowe przeprowadzenie porównawczych badań mikroskopowych fazy stałej wytrącającej się bez odparowywania. Tym niemniej wspólnym (i niezależnym od szczegółowej morfologii poszczególnych struktur) trendem było utrudnienie przez obecność D_2O tworzenia wyższych peptydów.

Opisane w ostatnim podrozdziale (3.3) turbidymetryczne badania mętności roztworów aminokwasów stanowią powrót do badań dynamiki ich peptyzacji w czasie i dlatego zastanawiam się, czy nie powinny one zostać omówione wcześniej, wręcz na początku części eksperymentalnej, a wyniki dla 7. dnia pomiarowego porównywane z widmami MS. W zasadzie są to jedyne pomiary, które pokazują pewną dynamikę zmian stanu układu w czasie bez istotnej w ten układ ingerencji. Doktorantka interpretuje niemonotoniczne zmiany mętności roztworów jako przejawy konkurencji między spontaniczną peptyzacją aminokwasów i hydrolityczną degradacją peptydów, co jest oczywiście możliwe, ale także może być



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



przejawem równolegle postępującej sedymentacji osadu peptydu o względnie wysokiej masie cząsteczkowej. Niestety procesy te trudno rozdzielić, nie mając dodatkowego, równoległego na osi czasu, źródła informacji. Dlatego wyniki pomiarów turbidymetrycznych mają w zasadzie ogólny i raczej pomocniczy charakter, niezaprzeczający jednak temu, że dodatek D₂O wpływa hamująco na proces agregacji.

Istotny dla oceny rozprawy problem powstaje przy lekturze s. 105, gdyż podane tam „Wnioski” stanowią w dużym stopniu raczej zestawienie opisanych wcześniej obserwacji/faktów eksperymentalnych. Przedmiotem rozprawy doktorskiej powinno być bowiem, zgodnie z Ustawą i dobrymi akademickimi obyczajami, „*oryginalne rozwiązanie problemu naukowego*”, który to problem w tym przypadku brzmi: „dlaczego D₂O hamuje proces peptyzacji aminokwasów”?

Tak skonstruowana rozprawa pozostawia więc wrażenie pewnego niedosytu, także z następujących powodów.

1. Skoro w części literaturowej Doktorantka niemało miejsca poświęciła skomplikowanym mechanizmom chemicznych reakcji oscylacyjnych, a nawet wspomina o wcześniejszych prostych modelach próbujących opisać oscylacyjną peptyzację aminokwasów, oczekiwałbym w prezentacji własnej pracy próby przynajmniej półilościowego zastosowania jednego z tych mechanizmów lub zaproponowania własnego, do opisu badanych przez Nią procesów. Niestety w rozprawie nie ma na ten temat nawet słowa komentarza, przynajmniej sugerującego, który z opublikowanych wcześniej dwóch modeli mógłby być zastosowany do opisu aktualnie wyznaczonych szeregów czasowych. Część literaturowa i własna są więc w pewnym stopniu niezrównoważone, a nawet poniekąd rozbieżne. Jest to ważna kwestia, ponieważ celem rozprawy doktorskiej w jej tradycyjnej koncepcji jest wykazanie przez Doktoranta/Doktorantkę umiejętności dojrzałej prezentacji wyników swojej pracy i twórczej interpretacji wyników.

2. Zgodnie z tym, co napisałem wyżej, choć inhibitujące przemiany aminokwasów działanie ciężkiej wody nie ulega wątpliwości w świetle opisanych i opublikowanych wyników badań, **w samej rozprawie** nie znajduję ani jednego zdania, które sugerowałoby jakikolwiek mechanizm tego zjawiska. Jak wspomniałem wyżej, w publikacjach, których Doktorantka jest współautorką, podane są odnośniki do prac opisujących wpływ D₂O na dynamikę wybranych, chemicznych reakcji oscylacyjnych i w każdej z tych prac zawarte są sugestie mechanistyczne, poparte konkretnymi mechanizmami reakcji. Naturalne jest więc oczekiwanie recenzenta, że w rozprawie pojawią się analogiczne końcowe wnioski, dotyczące wpływu ciężkiej wody na procesy peptyzacji. Dopiero **analiza publikacji**, których Doktorantka jest współautorką, wskazuje, iż takie sugestie zostały w nich poczynione. Dlaczego zatem nie zostały one ujęte w



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



rozprawie, pozostawiającej eksperymentalne fakty bez pogłębionej interpretacji? Należy przypomnieć, że - ściśle rzecz biorąc - recenzowana jest właśnie rozprawa, a nie publikacje.

I tak, przykładowo: w wieloautorskiej pracy A. Fulczyk et al.: *React. Kin. Mech. Catal.* 125 (2018) 555 wspomina się o możliwym dwukierunkowym działaniu D_2O : fizycznym oddziaływaniu typu dipol-dipol lub tworzeniu wiązania wodorowego między cząsteczkami D_2O i L-Cys, które na zasadzie kinetycznego efektu izotopowego miałyby wpływać na stałe szybkości w mechanizmie reakcji opisanym w dostępnym razem z publikacją suplementem. Inna, opisana w publikacji propozycja sugeruje wyczerpującą izotopową wymianę protonów w cząsteczkach L-Cys na deuterony, z także istotnymi konsekwencjami kinetycznymi. W kolejnej publikacji z 2019 roku o L-Met pojawia się sugestia roli wymiany izotopowej w grupach funkcyjnych $-COOH$ i $-NH_2$ w odniesieniu do molekularnych mechanizmów reakcji, które zawarte są w suplementie do publikacji, a nie ma o tym ani słowa w rozprawie. W publikacji z 2020 r., odnoszącej się do L-Hyp, pojawiają się sugestie o deuterowaniu grupy $>NH$ do $>ND$ jako głównego czynnika utrudniającego tworzenie wiązań peptydowych. Nawiasem mówiąc, w syntetycznym przeglądzie, opublikowanym w 2020 roku we „*Frontiers in Chemistry*” zestawione są znów głównie zasadnicze wyniki eksperymentalne, bez sugestii mechanistycznych.

Muszę dodać, że zawarte w opracowanej wersji rozprawy wydruki tych publikacji są niekompletne, nie zawierają bowiem istotnych suplementów, w których podane zostały różne propozycje mechanizmów reakcji. Na szczęście pełne wersje publikacji z wydawnictwa *Springer Nature* są dostępne w Internecie dla pracowników Uniwersytetu Warszawskiego. Uważam więc, że Doktorantka dysponowała wszelkimi danymi, aby w rozprawie, poza prezentacją danych doświadczalnych, zamieścić także konkretne wnioski lub przynajmniej, tak jak w publikacjach, sugestie mechanistyczne, odnoszące się do natury zjawisk interpretowanych jako oscylacyjne niestabilności i przede wszystkim – wpływu D_2O na stabilizowanie oryginalnych form aminokwasów. W końcu tytuł rozprawy wskazuje, że jej celem jest badanie wpływu ciężkiej wody na badane reakcje, a praca naukowa polega nie tylko na wykonaniu pomiarów i opracowaniu danych doświadczalnych, lecz także na interpretacji wyników. Nie ma co prawda wątpliwości co do oryginalności samego problemu oraz interesującego i inspirującego do dalszych rozważań materiału eksperymentalnego, ale opis zawarty w **rozprawie** pozostawia, jak wspominałem, uczucie pewnego niedosytu.

Wybrane dodatkowe uwagi szczegółowe:

s. 8, w 8 od góry: zapewne powinna to być „pula **wolnych** aminokwasów”

s. 8, w. 13 od góry: powinno być „**Cząsteczki aminokwasów** zbudowane są z centralnie...”

s. 8, podpis pod rys. 1 – powinno być „Schemat budowy **cząsteczki** aminokwasu....”



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



- s. 9 – sformułowanie „wiązanie peptydowe [...] tworzy się pomiędzy atomami w wyniku wzajemnego działania elektronów” jest tak lakoniczne, że może być mylące – elektrony się odpychają, a wiązania elektronowe powstają dzięki przyciąganiu się elektronów walencyjnych jednego atomu z dodatnio naładowanymi rdzeniami drugiego atomu, w wyniku czego łączna energia elektronów zaangażowanych w tworzenie wiązania ulega obniżeniu.
- s. 26 – tytuł podrozdziału 2.2.1 powinien brzmieć: „Reakcja Braya-Liebhaufsky’ego”
- s. 32 – czy jest możliwe, aby kwas malonowy uległ ODWRACALNEMU utlenianiu do CO₂ w tych warunkach?
- s. 33, reakcja (85) – brak znaku + po prawej stronie reakcji
- s. 37 – opisy kolumn w Tabeli 8 powinny być polskojęzyczne
- s. 39 – na czym polega różnica między zachowaniem „oscylacyjnym” i „fluktuacyjnym”?
- s. 50, w. 4 od góry: zapewne ściślej byłoby napisać, że sposobem otrzymywania D₂O jest elektrolityczny rozkład **naturalnej wody, prowadzący do zateżenia zawartej w niej D₂O.**
- s. 50: dlaczego równanie (100) ma ilustrować pozabawianie wody deuteru?
- s. 55 – czy pojęcia **peptyzacji** (p. 1) i **kondensacji** (p. 2) są tu użyte jako synonimy?
- s. 59 – Tabela 13, 14: jakie procenty (masowe, objętościowe, molowe) zostały przyjęte w podanych składach mieszanin?
- s. 65 i następne: opisy osi rysunków powinny być polskojęzyczne. Przykładowo – jaki jest polskojęzyczny równoważnik terminu „**Power as MSA**” (np. na rys. 23)?

W podsumowaniu podkreślam raz jeszcze niedoskonałą konstrukcję samej rozprawy, przy pozytywnej jednak całościowej ocenie merytorycznej materiału zawartego po uwzględnieniu pełnej treści publikacji. Z tego względu uważam, iż ujęty w ten sposób dorobek naukowy Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). Wnoszę więc o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Prof. dr hab. Marek Orlik