



UNIwersytet Medyczny
w Lublinie
KATEDRA CHEMII

ZAKŁAD CHEMII FIZYCZNEJ

ul. Chodźki 4A 20-093 Lublin

Dr hab. n. farm. Beata Polak

Lublin. 05.05.2022

Zakład Chemii Fizycznej,

Wydział Farmaceutyczny

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk zatytułowanej: „Badanie wpływu ciężkiej wody na reakcje samorzutnej peptyzacji wybranych α -aminokwasów o znaczeniu biologicznym”, przedstawionej Radzie Naukowej Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Fulczyk została przygotowana w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego pod kierunkiem Pana dr hab. Mieczysława Sajewicza, profesora UŚ.

Biorąc pod uwagę strukturę wyżej wspomniana rozprawa została przygotowana w formie 109- stronicowej dysertacji podzielonej na 3 główne części. Pierwsza z nich, teoretyczna, kolejna to metodyka badań połączona z częścią badawczą, ostatnia zawiera uzyskane wyniki i ich dyskusję. Całość uzupełnia piśmiennictwo, wykaz stosowanych skrótów oraz odbitki opublikowanych prac stanowiących cykl badawczy związany z dysertacją (7).

Tematem przewodnim rozprawy są reakcje i procesy oscylacyjne. Odbiegają one od ogólnie przyjętych reguł reakcji chemicznych, a dotyczą układów nierównowagowych, dla których pojawiają się fluktuacje pośrednich produktów reakcji. Obserwowane procesy charakteryzuje sposób zachowania się materii nieożywionej przypisany żywym organizmom,

prowadzący do samoorganizacji układu i powstawania nowych struktur. Niektórzy badacze twierdzą, że reakcje te mogą stanowić wytłumaczenie powstania i funkcjonowania życia na Ziemi. Są one również obiektem zainteresowania Promotora i to zapewne zaowocowało tematem ocenianej pracy doktorskiej.

Część teoretyczna manuskryptu dotyczy kilku zagadnień. Przedstawiono jest w niej charakterystykę fizykochemiczną oraz funkcje biologiczne wybranych L-aminokwasów (cysteiny, metioniny, proliny, hydroksyproliny, alaniny, histydyny), która tłumaczy wybór tychże aminokwasów do przyszłych badań.

Kolejne zagadnienie omówione w części teoretycznej dysertacji obejmuje reakcje i procesy oscylacyjne. W tym podrozdziale szerzej zaprezentowano typy reakcji i procesów oscylacyjnych (między innymi popularne reakcje Biełousowa-Żabotyńskiego czy Briggsa-Rauschera), jak i przykładowe oscylacje w układach homo- lub heterogenicznych. Dodatkowo przedstawiono labilność reakcji inwersji chiralnych kwasów karboksylowych oraz polikondensacji i peptyzacji aminokwasów. Zaprezentowano również wybrane sposoby oszacowania zachodzenia oscylacji z wykorzystaniem technik chromatograficznych. Na podstawie danych literaturowych opisano model procesu oscylacyjnej oligomeryzacji kwasu mlekowego. Przedstawiono również badania związane z dynamiką długookresowej peptyzacji mieszaniny L-proliny i L-feniloalaniny, podczas której zaobserwowano ewoluowanie (przechodzenie) układów homogenicznych w heterogeniczne i odwrotnie.

Kolejny rozdział poświęcono charakterystyce ciężkiej wody. Przedstawiono w nim właściwości fizykochemiczne, otrzymywanie, zastosowanie oraz wpływowi na organizmy żywe tego związku.

Każdy z opisanych wcześniej podrozdziałów teoretycznych przedstawiony jest w rozprawie jako osobna część z własnymi pozycjami literaturowymi.

Treści opisane w części teoretycznej, a dotyczące przykładów procesów samorzutnej peptyzacji zachodzącej podczas przechowywania aminokwasów z utworzeniem układów homo – i heterogenicznych zostały szerzej wykorzystane w części doświadczalnej. Do zbadania każdego z wyżej wspomnianych procesów zastosowano szereg technik analitycznych. Monomery aminokwasów i układy homogeniczne zbadano z wykorzystaniem

chromatografii cieczowej połączonej z kilkoma sposobami detekcji (ELSD, DAD lub spektrometrią mas). Natomiast mikro i nanostruktury peptydowe tworzące się jako precipitat określono z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Kolejną technikę badawczą, turbidymetrię, wykorzystano do jakościowego zbadania procesów samorzutnej peptyzacji, do której dochodzi podczas przechowywania wodno-organicznych roztworów pojedynczych aminokwasów.

Wyżej wspomniany proces, obserwowany podczas przechowywania roztworów wybranych aminokwasów, został zbadany poprzez cykliczne pomiary zmian wysokości pasm chromatografowanych wybranych związków technikami achiralnej HPLC połączonej z detekcją ELSD lub DAD. Uzyskane wyniki w celu potwierdzenia okresowości zmian zostały poddane transformacji Fouriera. Spośród badanych monomerów aminokwasów zauważono, że zmiany wysokości pasm L-cysteiny i L-proliny charakter okresowy z pikiem powtarzającym się co odpowiednio około 24 godziny i 20,8 godziny przechowywania (HPLC z detekcją ELSD). Porównując procesy samorzutnej peptyzacji L-proliny i L-hydroksyproliny można zauważyć, że ten ostatni aminokwas nie wykazuje oscylacyjnych zmian stężenia podczas przechowywania, co jest wytłumaczone hamującym wpływem grupy hydroksylowej.

Natomiast badania roztworów monomerów L-metioniny wykazały, że jej stężenie ulegało zmianom podczas przechowywania, co wykazano podczas chromatograficznych badań zależności wysokości jej piku w funkcji czasu przechowywania. Niestety tym zmianom nie udało się przypisać okresowości w badanym przedziale czasowym.

Technikę HPLC z detekcją DAD zastosowano do określenia wpływu czasu przechowywania próbek monomerycznych L-alaniny i L-histydyny na zmiany ich zawartości w próbkach (oznaczone przez zmiany wysokości pasma badanych związków). Dokładniejsze badania z wykorzystaniem transformacji Fourierowskiej dowiodły, że w przypadku L-alaniny mamy do czynienia początkowo z dwoma oscylacjami występującymi przez około 10 godzin, które ulegają samorzutnemu tłumieniu. Natomiast w przypadku doświadczeń dotyczących roztworów monomerycznych L-histydyny zaobserwowano zmniejszanie się zawartości monomerów w próbce podczas przechowywania, jednak proces ten nie miał charakteru cyklicznego.

We wszystkich przeprowadzonych badaniach zauważono, że rozpuszczenie monomerów aminokwasów tylko w ciężkiej wodzie i przechowywanie przez pewien czas nie skutkuje procesem samorzutnej peptyzacji. Ta obserwacja zaowocowała dalszymi badaniami związanymi z określeniem wpływu zawartości ciężkiej wody w roztworach badanych monomerów aminokwasów na proces samorzutnej peptyzacji. W początkowym etapie badań przeprowadzono samorzutną peptyzację aminokwasów w roztworach niezawierających ciężkiej wody i scharakteryzowano otrzymane rozpuszczalne monomery i peptydy z wykorzystaniem widm masowych. Stanowiły one materiał porównawczy dla układów ze zmienną zawartością ciężkiej wody. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że wpływ stężenia ciężkiej wody w próbce aminokwasu na jego samorzutną peptyzację jest odmienny dla cysteiny, proliny i alaniny.

Struktury wytrąconych peptydów wytworzonych podczas samorzutnej peptyzacji badanych aminokwasów (układy heterogeniczne) zbadano z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Zauważono, że każdy z aminokwasów charakteryzuje się innymi profilami zdjęciowymi, a obecność ciężkiej wody ma wpływ na wielkość i rozpuszczalność agregatów peptydowych tworzących się podczas przechowywania. Zwiększanie stężenia ciężkiej wody w roztworach aminokwasów owocowało stopniowym hamowaniem procesu peptyzacji oraz tworzeniem mniejszych i bardziej rozpuszczalnych struktur.

Do jakościowego określenia samoorganizacji aminokwasów w peptydy podczas przechowywania wykorzystano pomiary turbidymetryczne. Podczas badań zaobserwowano, że samorzutna peptyzacja powodująca zmętnienie roztworu L-cysteiny, L- metioniny i L- proliny charakteryzuje się opóźnieniem czasowym, na które ma wpływ zwiększanie zawartości ciężkiej wody.

Biorąc pod uwagę ogólny wygląd rozprawa jest przygotowana dosyć starannie, tabele, rysunki znajdujące się na manuskrypcie są czytelne. Niestety zdarzają się w niej błędy oraz usterki, o nich poniżej:

Strona 9 – sformułowanie: „cztery formy występowania białka” jest niepoprawne. Z kontekstu zdania wynika, że chodzi o 4 struktury związane z budową białka (struktury pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe).

Opisane na stronach 16 i 17 aminokwasy (L-alanina i L-histydyna) wywodzą się od tego samego kwasu propanowego, ale ich nazwy chemiczne są inne. Tak więc L-alanina przedstawiona jest jako to kwas L- α -aminopropionowy. Natomiast L-histydyna opisana jest jako kwas α -amino- β -imidazo- γ -ilo propanowy. Który sposób nazwania aminokwasów jest poprawny?

W równaniach reakcji 1 i 2 przedstawionych na stronie 25, elektrony (e) są przedstawione w indeksie górnym. W miejscu powinien być wyłącznie ładunek.

W równaniu 4 na stronie 26 w zapisie jest brak ładunku dla jonu dichromianowego.

Reakcja utleniania w równaniu 12 na stronie 28 dotyczy jonów jodkowych, I^- , a nie tak, jak opisano we wcześniejszym fragmencie tekstu I^+ .

W równaniu 85 na stronie 33 brak jest plusa po stronie produktów.

Strona 34, Tabela 7 nie zawiera prawidłowego rozliczenia równań reakcji 1, 2, 5-9, 11-15 dla kolumny z lewej strony.

Strona 49, Tabela 9, powinna zawierać jednostki zgodne z obowiązującym układem SI, czyli kJ/mol, a nie kcal/mol w przypadku funkcji termodynamicznych, napięcie powierzchniowe powinno być wyrażone w mN/m, a nie w dyn/cm.

Opisane powyżej pomyłki (usterki) wynikają z nie dość wnikliwej uwagi podczas sprawdzania gotowego manuskryptu, ale nie mają istotnego wpływu na wartość pracy.

Po przeczytaniu pracy doktorskiej nasuwają się następujące pytania:

Jaka była przyczyna zastosowania tylko L-aminokwasów do zbadania reakcji oscylacji?

Czy takie reakcje są możliwe dla D-aminokwasów?

Z jakiego powodu wybrano wysokość pasma (piku) chromatografowanej substancji jako miarę zmienności wykorzystaną podczas określania oscylacji?

Czy zastosowanie do tego celu pola powierzchni pasma powodowałoby problemy interpretacyjne?

Podsumowując, można potwierdzić istotną rolę Pani Agnieszki Fulczyk w badaniach odnotowaną poprzez kolejność w porządku nazwisk autorów we wszystkich artykułach

stanowiących podstawę ocenianej pracy doktorskiej (Pani Agnieszka jest pierwszym autorem). Naukową doniosłość wybranego tematu dokumentują czasopisma, w których te prace zostały opublikowane, należące do Journal Citation Reports (tzw. listy filadelfijskiej), ich sumaryczny współczynnik oddziaływania, IF, wynosi ponad 16,5.

Biorąc pod uwagę powyżej wspomniane, można stwierdzić, że doktorska Pani mgr inż. Agnieszka Fulczyk, spełniła wymagania przedstawione w Ustawie o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych (Dz. U. z 2003r, nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Instytutu Chemii w Katowicach o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo z uwagi na liczbę technik analitycznych wykorzystanych podczas realizacji doświadczeń, współpracę międzynarodową oraz wysoki współczynnik oddziaływania prac związanych z cyklem doktorskim wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Instytutu Chemii o wyróżnienie rozprawy.

Beata Pelale