



Prof. dr hab. Marek Orlik
Wydział Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego
Ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa

Warszawa, 30 czerwca 2017 r.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Anny Łągiewki:
„Badanie samorzutnych reakcji inwersji chiralnej i peptyzacji wybranych aminokwasów białkowych”

Recenzowana rozprawa powstała w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, jako wynik wspólnych badań Doktorantki i Pani mgr Agnieszki Godziek, prowadzonych pod kierunkiem Pani Prof. dr. hab. Teresy Kowalskiej (Promotora P. mgr Łągiewki) i Pana Dr. hab. Mieczysława Sajewicza (Promotora jednocześnie przedłożonej mi do recenzji rozprawy P. mgr Agnieszki Godziek). Wyniki tych badań zostały opisane we wspólnych publikacjach, częściowo z udziałem także innych Autorów. Jest zatem oczywiste, że ocena indywidualnego dorobku każdej Doktorantki wymaga postępowania, opisanego w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r, a polegającego na przedłożeniu stosownych oświadczeń wszystkich współautorów (Dz. U. z dnia 30.09.2016, poz. 1586). Oświadczenia takie, podpisane przez obie w/w Doktorantki, ich Promotorów oraz innych Autorów otrzymałem i stanowią one istotny element oceny każdej rozprawy, niezależnie od szczegółowej recenzji każdej z nich.

Spośród łącznie 13 publikacji, których Pani mgr Anna Łągiewka (Maciejowska) jest współautorem. Doktorantka zadeklarowała 9 prac jako tematycznie związanych z Jej rozprawą doktorską. Sześć z tych dziewięciu publikacji (o numerach 2, 4, 5, 6, 7, 8 w zestawieniu na s. 141-142 rozprawy) również Pani mgr Agnieszka Godziek deklaruje jako tematycznie związane z Jej rozprawą. Prace te zostały opublikowane w dobrych czasopismach: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* (IF ok. 0,6), *Journal of Chromatographic Science* (IF ok. 1,4), *Journal of Planar Chromatography* (IF ok. 0,7), *Israel Journal of Chemistry* (IF ok. 2,2), *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* (IF ok. 1,2) oraz *Acta Chromatographica* (IF ok. 0,6). Pozostałe prace zostały opublikowane w *Current Protein & Peptide Science* (IF ok. 3,2), a jedno opracowanie to rozdział w wydawnictwie *Planar Chromatography – Mass Spectrometry* (Taylor & Francis Group). Deklarowany przez p. mgr Łągiewkę udział w poszczególnych publikacjach, potwierdzony oświadczeniami pozostałych współautorów, waha się od 20% do 55%, przyjmując średnią wartość ok. 40%. Oczywiście istotne znaczenie ma także to, że obie Doktorantki nie pracowały z dokładnie tymi samymi układami aminokwasów, wnosząc zatem swój indywidualny wkład merytoryczny do każdej publikacji zestawiającej ich równolegle prowadzone badania. Oświadczenie Prof. I. Epsteina z USA, dotyczące jego współautorstwa w jednej z publikacji z własnym udziałem 20% jednoznacznie wskazuje na jego zasadniczą rolę w opracowaniu teoretycznego modelu dynamiki oscylacyjnej w badanych przez obie Doktorantki układach aminokwasowych. Powyższe informacje zostaną zawarte także w jednocześnie sporządzanej przeze mnie recenzji rozprawy doktorskiej p. mgr Agnieszki Godziek.



Ogólnie rzecz ujmując, opisane w rozprawie p. mgr Łągiewki, jak również p. mgr Godziek, wyniki badań i ich interpretacja stanowią kontynuację prowadzonych wcześniej w zespole Pani Prof. Teresy Kowalskiej studiów nad intrygującymi zjawiskami niemonotonicznej dynamiki przemian, jakim w roztworach ulegały związki z grup profenów, hydroksykwasów, a także aminokwasów. Można te procesy od strony fenomenologicznej nazwać oscylacyjnymi, choć ścisłość tej klasyfikacji wymaga potwierdzenia, iż spełniają one konkretne mechanistyczne kryteria dynamiki oscylacyjnej, wymagające między innymi identyfikacji pętli dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych. Tym razem przedmiotem badań opisanych w obu recenzowanych rozprawach stały się analogiczne procesy dotyczące aminokwasów białkowych, ulegających w warunkach prowadzonych eksperymentów samorzutnej peptyzacji. Obie doktorantki stosowały aminokwasy: cysteinę, fenyloalaninę, hydroksyprolinę i metioninę (w postaci odpowiednich enancjomerów lub mieszanin racemicznych), Pani mgr Łągiewka także fenyloglicynę, a Pani mgr Godziek – prolinę, serynę i treoninę. Metodyka eksperymentalna obu prac jest podobna i obejmuje techniki takie, jak: chromatografia cienkowarstwowa (TLC), także sprzężona ze spektrometrią mas (TLC-MS), wysokosprawna chromatografia cieczowa (także w wersji sprzężonej ze spektrometrią mas. HPLC-MS), mikroskopia optyczna, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), turbidymetria, polarymetria, przy czym P. mgr Łągiewka posługiwała się także techniką chiralnej chromatografii gazowej, a Pani mgr Godziek - spektroskopią w podczerwieni.

Po tej wstępnej charakterystyce obu rozpraw przejdę teraz do szczegółowej analizy rozprawy Pani mgr Anny Łągiewki.

Od strony formalnej rozprawa Pani mgr Łągiewki ma tradycyjny, powszechnie w środowisku naukowym akceptowany układ. Całość tego obszernego opracowania liczy 148 stron, z czego 57 przypada na część literaturową, a 69 na część opisującą badania własne. Podany jest także spis publikacji własnych oraz licznych wystąpień konferencyjnych. Spis pozostałej literatury zawiera 186 pozycji. W przekazanej mi zwartej wersji rozprawy załączone są także kopie publikacji stanowiących podstawę ubiegania się o stopień naukowy doktora.

Przejdę teraz do omówienia **części literaturowej**. Zawarta jest w niej podstawowa charakterystyka aminokwasów (nomenklatura, struktura cząsteczek), wzbogacona interesującymi informacjami o ich możliwej biogenezie. Obowiązkiem recenzenta jest jednak zwrócenie uwagi na pewną nieścisłość, jaka mogłaby wynikać z dosłownej interpretacji rys. 4 sugerującego, że jon obojnaczy istnieje w dokładnie obojętnym środowisku, podczas gdy pH punktu izoelektrycznego jest niekoniecznie równe 7, a przy tym specyficzne dla danego aminokwasu. Oczywiście rozumiem, iż schemat ten należy interpretować w ten sposób, że przejście od czystej formy anionowej do czysto kationowej aminokwasu zachodzi także poprzez układ o $\text{pH} = 7$. Z kolei w definicji punktu izoelektrycznego kluczowe wydaje mi się wskazanie w pierwszej kolejności na dominujące stężenie formy obojnaczej, zgodnie z zaleceniem IUPAC-u, aby punkt izoelektryczny definiować jako odpowiadający zerowemu wypadkowemu ładunkowi obiektu (*entity*). Nieprecyzyjne, a nawet błędne jest sformułowanie na s. 11, iż „w punkcie tym [izoelektrycznym] roztwór aminokwasu jest elektrycznie obojętny, w wyniku międzycząsteczkowej i wewnątrzcząsteczkowej kompensacji różnoimiennych ładunków elektrycznych”. Roztwór aminokwasu dla każdej wartości pH, podobnie jak każdy inny roztwór w typowych warunkach, jest elektrycznie obojętny jako spełniający realną fizycznie zasadę elektroobojętności, zgodnie z którą ładunek kationów jest kompensowany ładunkiem anionów.

Zawarte na s. 12-16 tabelaryczne zestawienie 20 białkowych aminokwasów stanowi pożyteczny, syntetyczny przegląd ich struktur i roli fizjologicznej. Nieco niezręczne jednak jest użyte



w Tab. 1, na s. 12, w odniesieniu do leucyny, sformułowanie, iż „zwiększa [ona] stymulację syntezy” „zwiększanie” jest bowiem równoznaczne ze „stymulacją”.

Na s. 18 rozpoczyna się ogólna charakterystyka peptydów i tu także pojawia się pewna nieścisłość, iż „peptydy są polimerami aminokwasów”, chociaż w następnych zdaniach zawarta jest wyraźna informacja, iż tworzenie peptydu jest reakcją kondensacji, zatem peptydy są raczej polikondensatami niż polimerami aminokwasów.

Do pewnego nieporozumienia interpretacyjnego, na poziomie kwestii podstawowych, może także prowadzić sformułowanie na s. 19, iż „wiązanie kowalencyjne w cząsteczce jest tworzone między atomami w wyniku wzajemnego działania elektronów, które przy tym stają się wspólne dla obu łączących je atomów”. Elektrony jako cząstki ujemnie naładowane odpychają się i dlatego nie można wyłącznie w ten sposób tłumaczyć wiązania chemicznego – to przyciąganie między elektronami *jednego* z atomów i *dodatnio naładowanym jądrem* drugiego atomu jest źródłem siły przyciągającej oba atomy, czyli efektu wiążącego, a ostateczne wzajemne usytuowanie atomów wynika z optymalnego bilansu sił przyciągających i odpychających, zapewniających osiągnięcie minimalnej energii potencjalnej.

Istotne znaczenie dla merytorycznej treści rozprawy ma następujący dalej rozdział 3 „Chromatograficzny rozdział enancjomerów aminokwasów”, choć początkowe zdanie „Naturę Ziemi charakteryzuje asymetria” jest nieco zagadkowe poprzez swoją ogólność i warto by je uściślić poprzez odpowiednią argumentację.

Merytoryczny charakter ma uwaga odnosząca się do zdania na s. 34, w którym „absorpcja molowa enancjomerów” powinna być wyrażona jako „absorbancja”, ponieważ absorpcja jest zjawiskiem, a absorbancja – jego ilościową miarą.

Rozdział 4 części teoretycznej: „Analiza peptydów techniką spektrometrii mas” jest dobrze uzasadniony merytoryczną zawartością rozprawy w części badań własnych, w trakcie których ustalana była sekwencja aminokwasów w peptydach. Co jednak oznacza pojęcie: „metoda delikatna”? Merytoryczną nieścisłością jest użyte na s. 37 sformułowanie „z dołączoną cząsteczką protonu”. Podobnie ściślej niż „długość peptydu” brzmiałby termin „długość CZĄSTECZKI peptydu” (s. 38). Ponadto, czy fragmentacji ulegają wiązania, czy raczej cząsteczki, a wiązania ulegają ZERWANIU (s. 38)?

Stosownej i rozszerzonej oceny wymaga treść rozdziału 5, w zamierzeniu mającego syntetycznie opisać chemiczne reakcje oscylacyjne. Dostrzegam w tym tekście wiele merytorycznych nieścisłości. Nie jest prawdą, że w przebiegu klasycznych (tzn. nieoscylacyjnych) reakcji, w których z biegiem czasu ilość substratów maleje, a produktów rośnie, „cała reakcja znajduje się w stanie równowagi”. Dopóki stężenie substratów maleje, a produktów rośnie, stan równowagi jeszcze nie nastąpił, układ do niego dopiero w ten sposób dąży, a gdy go osiągnie, stężenia reagentów przestaną się zmieniać, osiągną bowiem wtedy wartości równowagowe, dla których szybkości reakcji prostych i odwrotnych ulegną wyrównaniu. Bardzo nieprecyzyjny jest także opis reakcji oscylacyjnych. „Pewien nietrwały produkt przejściowy”, a raczej produkty powstają w większości, jeśli nie w praktycznie wszystkich reakcjach chemicznych, niekoniecznie oscylacyjnych. Cechą homogenicznych reakcji oscylacyjnych jest natomiast to, że stężenia tych nietrwałych produktów przejściowych zmieniają się właśnie w sposób oscylacyjny. Niejasne jest zdanie: „potencjalne rozproszenie energii uwarunkowane jest ujemnym wkładem entropii do układu, która jest produktem ubocznym głównego procesu dyssypatywnego, związanego z dużą produkcją entropii, zgodną z warunkami spełniającymi II zasadę termodynamiki”. Ta relacja jest raczej odwrotna - dyssypacja, czyli rozpraszanie energii, związana z produkcją entropii, jest niezbędna dla zrównoważenia spadków entropii związanych z procesem oscylacyjnym czy innym rodzajem uporządkowania. Niezrozumiały jest warunek 3) dynamiki oscylacyjnej, podany na s. 41: „Procesy powinny przebiegać według etapowych mechanizmów reakcji,



a więc posiadać pętle”. Etapowość reakcji nie jest tożsama z pojęciem „pętli”, tym bardziej że chodzi tu o pojęcie „pętli sprzężeń zwrotnych”. W istocie chodzi o to, aby w wieloetapowym mechanizmie reakcji zaistniały pętle dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych, na przemian dominujące, przez co stężenia pewnych substancji najpierw autokatalitycznie rosną, zanim ujemne sprzężenie zwrotne na pewien czas nie powstrzyma i nie odwróci tego wzrostu. Innymi słowy, wzrost stężenia pewnego produktu przejściowego jest związany z jego autokatalityczną produkcją, a z pewnym opóźnieniem włącza się ujemne sprzężenie zwrotne, które hamuje autokatalizę.

Nie jestem też pewien, czy – zgodnie z zawartą w tekście rozprawy informację - reakcje oscylacyjne są obecne tak długo, jak długo istnieje życie na Ziemi, choć materia ożywiona musiała zapewne w swej dynamice zawierać sprzężenia zwrotne jako podstawowe mechanizmy regulacyjne. Niejasne zdania na s. 41/42, odwołujące się do prac Hodgkina i Hukleya powinny zawierać odniesienie do klasycznej pracy Turinga, co następuje w tekście z pewnym opóźnieniem, jest to więc kwestia logicznej kolejności opisu poszczególnych zagadnień. Informacja o pracach Prigogine’a powinna być uściślona w ten sposób, że zjawiska oscylacyjne mogą występować JEDYNIĘ poza równowagą termodynamiczną.

Kompletnie niejasne jest zdanie na s. 42: „Wiele powstających struktur w przestrzeni układów chemicznych znajdujących się poza krytycznym punktem stabilności w stosunku do dyfuzji rytmu (!) odpowiada organizacji czasowej, która pojawia się poza krytycznym punktem stabilności w nierównowagowym stanie stacjonarnym”. Nie bardzo także rozumiem sformułowanie, iż „pozarównowagowa niestabilność jest spowodowana układem, a nie jego otoczeniem”. W zasadzie cały odnośny akapit jest niełatwy do zrozumienia. W spójnej prezentacji należało, po pierwsze, gładko przejść od struktur czasowych, czyli od oscylacji stanu układu jako całości w funkcji czasu, omawianych wcześniej, do struktur (także) dyssypatywnych, realizujących się także lub wyłącznie w funkcji współrzędnej przestrzennej. To o tych ostatnich pisał m. in. Alan Turing swej fundamentalnej pracy z 1952 r.: *“The Chemical Basis of Morphogenesis”*. Po drugie, całe to zagadnienie może być ogólnie opisane w bardzo prosty sposób: oscylacje wyłącznie w funkcji czasu oznaczają, iż stan stacjonarny układu dyssypatywnego jako całości utracił stabilność na rzecz oscylacji - w ten sam sposób w całej objętości układu. Istnieje także możliwość, iż utrata stabilności zachodzi na drodze szczególnego współdziałania kinetyki reakcji chemicznej o odpowiedniej charakterystyce i dyfuzji (lub innego rodzaju transportu masy), i wtedy dochodzi do powstawania struktur pokazujących przestrzenne zróżnicowanie rozkładu stężeń, czyli do czasowo-przestrzennych lub przestrzennych struktur dyssypatywnych. Przykładem tych pierwszych są fale chemiczne w reakcji Biełousowa-Żabotyńskiego, a tych drugich - struktury Turinga.

Dalsze zawarte w tym rozdziale rozważania ukazują kolejne nieścisłości lub nieporozumienia. Bifurkacja Hopfa nie jest jedynym sposobem wyłaniania się oscylacji ze stanu stacjonarnego, choć trzeba przyznać, że najczęściej w realnych układach spotykanym. Całkowicie niezrozumiałe jest stwierdzenie: „gdy układ przekroczy cykl graniczny i utraci stabilność, może przejść w jakościowo nowe zachowania, a taka zmiana nazywana jest bifurkacją”. Cykl graniczny nie jest przekraczany (w każdym razie nie spontanicznie, bez celowego zaburzenia zewnętrznego), jest natomiast (z definicji – jako graniczny) osiągany asymptotycznie jako trajektoria w przestrzeni fazowej odpowiadająca stabilnym oscylacjom. Cykl graniczny powstaje na drodze bifurkacji Hopfa wtedy, gdy - w wyniku ściśle określonych warunków matematycznych - stabilność utraci stan stacjonarny, wokół którego ten cykl się rozwija, a stan stacjonarny istnieje wtedy nadal, lecz po przekroczeniu punktu bifurkacji Hopfa już jako stan stacjonarny niestabilny. Bifurkacja oznacza, najprościej mówiąc, jakościową zmianę w zachowaniu układu dynamicznego, związaną ze zmianą stabilności stanu(-ów). Innymi słowy, sekwencja zdarzeń prowadząca poprzez bifurkację Hopfa od strony zachowania jeszcze nieoscylacyjnego, w reprezentacji odpowiedniej przestrzeni fazowej, jest następująca: najpierw istnieje



stabilny stan stacjonarny, który pod wpływem zmiany parametrów kontrolnych w punkcie bifurkacji Hopfa traci asymptotyczną stabilność i uzyskuje wtedy charakter centrum, a następnie, po przekroczeniu tego punktu bifurkacji rozwija się wokół tego niestabilnego stanu stabilny cykl graniczny, czyli niegasnące, stabilne oscylacje stężeń w funkcji czasu.

Wspomniany na s. 43 model to model Chua, a nie Chuasa. Odnosny badacz nosi nazwisko Chua, a nieprawidłowy zapis wynika prawdopodobnie z dosłownego przełożenia na polski anglojęzycznej formy dopełniacza „Chua’s”. Poza tym nie jest to model z „homogenicznym rozkładem reagentów”, a w oryginalnej wersji – prosty obwód *elektryczny*, wykazujący, co najważniejsze, zachowanie chaotyczne (w sensie chaosu deterministycznego). Podobnie oryginalny model van der Pola odnosi się do obwodów elektronicznych (historycznie – z lampą elektronową), czyli także do układów fizycznych, a nie do chemicznych.

Następujące dalej stwierdzenie, że model Prigogine’a i Lefevera (czyli „Brukselator”) jest w stanie generować fale takie, jak obserwowane eksperymentalnie w reakcji Biełousowa-Żabotyńskiego, także nie jest zgodne z prawdą. Mechanizm powstawania fal w Brukselatorze, o dynamice nie wykazującej pobudliwości, a wymagający zróżnicowania współczynników dyfuzji produktów przejściowych jest zasadniczo odmienny od współdziałania z dyfuzją pobudliwego układu B-Ż. Fale w tej ostatniej reakcji można modelować za pomocą mechanizmu FKN, czy też jego uproszczonej wersji, znanej jako OREGONATOR, ale to zupełnie inny model kinetyczny.

Przytoczony opis mechanizmu Brukselatora odwołuje się do reagenta C, którego model nie zawiera. Następujący dalej opis utraty stabilności stanu stacjonarnego jest nawet spójny, należy jednak wskazać (s. 44), że stabilność cyklu granicznego przejawia się nie tym, że DO, lecz DLA ustalonych warunków początkowych dążą DO NIEGO wszystkie trajektorie.

Osobnego omówienia wymagają rysunki 14 i 15 oraz ich opisy, odnoszące się do modelowania oscylacyjnej dynamiki stężeń w Brukselatorze. Nieścisły jest podpis pod rys. 14, sugerujący, iż „przestrzeń fazowa [ZOSTAŁA] uzyskana dzięki zintegrowaniu numerycznemu równań kinetycznych w Brukselatorze”. Przestrzeń fazowa nie powstała w wyniku całkowania, została bowiem wcześniej odpowiednio zdefiniowana, tu poprzez współrzędne stężeń x i y . Numeryczne całkowanie prowadzi natomiast do uzyskania przebiegu TRAJEKTORII fazowych w tej już zdefiniowanej przestrzeni fazowej. W podpisie brakuje też wartości stężenia substratu A, przez co nie wiadomo, jaki jest stosunek stężeń B/A, decydujący o tym, po której stronie i jak daleko od punktu bifurkacji Hopfa rozwija się dynamika układu, choć z rysunku wynika, że jest to ogólnie zachowanie oscylacyjne. Co więcej, rysunek ten nie odpowiada dokładnie oryginalnemu schematowi Brukselatora ze s. 43, także dlatego, że w jego podpisie pojawia się kompletnie niejasna informacja o stężeniu formy Z, która w Brukselatorze na s. 43 w ogóle nie występuje. Ponadto przypisuje się stanowi oznaczonemu jako (b) niezgodność z nieprecyzyjnie tu użytym określeniem „adiabaticznej ewolucji zmiennej Z”. Przyczyną tych niejasności jest to, że rys. 14 został nieco bezkrytycznie skopiowany z pozycji literaturowej [137], w której jest to rys. 5. Autorzy tej publikacji, współtwórcy oryginalnego Brukselatora, odnoszą się w niej do krytycznych opinii na temat swojego modelu, m. in. poddających w wątpliwość realność chemiczną zawartego w nim etapu trójcząsteczkowego. W swoim uzasadnieniu rozdzielają oni ów etap na dwa elementarne, w które zaangażowana jest dodatkowa forma Z. Następnie wykazują, że Z jest tzw. „szybką zmienną”, tzn. o dynamice relatywnie szybszej niż dynamika form X i Y, dzięki czemu może ona zostać wyeliminowana z jawnego opisu za pomocą równań różniczkowych na drodze tzw. adiabaticznej *eliminacji*, co w istocie odpowiada przybliżeniu stanu stacjonarnego dla Z. Bez tych wyjaśnień treść i podpis pod rys. 14 (nieprecyzyjnie zresztą przełożony z języka angielskiego, w którym zawarta jest jednoznaczna informacja o adiabaticznej *eliminacji* zmiennej Z) są niezrozumiałe.

Analogiczna sytuacja wystąpiła dla rys. 15, będącego kopią rysunku 2 z pozycji literaturowej [135]. W podpisie tego czteroczęściowego rysunku występuje czterokrotnie parametr α , którego sens



nie jest nigdzie wyjaśniony. Co więcej, oscylacje dotyczą zmiennych oznaczonych jako u_1 i u_2 , które też nie są opisane. Dopiero analiza oryginalnej publikacji V. Gafiyuchuka i B. Datski w *Physics Letters A* pozwala pojąć, że rys. 15 dotyczy modelu Brukselatora zmodyfikowanego czysto matematycznie w ten sposób, że pochodne rzędu pierwszego, typowe dla równań kinetyki chemicznej, zostały zastąpione przez pochodne rzędu niecałkowitego α , co oczywiście oznacza pogłębienie abstrakcyjnego (z punktu widzenia chemika) charakteru rozważań. Zamieszczony w rozprawie rysunek pokazuje po prostu wpływ owego rzędu pochodnej ($\alpha = 1,05; 1,4; 0,9$ i $0,7$) na dynamikę tak zmodyfikowanego Brukselatora, ale nie ma to wiele wspólnego z jego oryginalną wersją, podaną na s. 43 rozprawy. Opisane powyżej problemy pokazują, jak ważne jest zadawanie sobie pytania na każdym etapie tworzenia własnego, także przeglądowego opracowania, czy naprawdę rozumiemy opisywane zagadnienia. Rozdział 5.2 o reakcjach oscylacyjnych zasługuje zatem na krytyczną ocenę, zarówno ze względu na jego kompozycję, jak i błędy oraz niejasności merytoryczne.

Następujący dalej rozdział 5.3 omawia wyniki wcześniejszych, wykonanych w zespole Pani Prof. Kowalskiej, badań profenów i hydroksykwasów, które w roztworach wykazywały przemiany objawiające się niemonotonicznymi zmianami proporcji między enancjomerami, kwalifikowanymi jako procesy oscylacyjne, w tym jako inwersja chiralna. W początkowym okresie tamtych badań pojawiało się, wyrażane także przeze mnie w poprzednich recenzjach, pytanie o możliwość zachodzenia takich procesów w układzie homogenicznym, w świetle motywowanej zasadą wzrostu entropii tendencji do monotonicznej racemizacji. Na przykład, badania opublikowane przez Yuchuna i in. w *International Journal of Pharmaceutics*, 196 (2000) 21 pokazywały, monitorowany techniką HPLC, monotoniczny postęp racemizacji ibuprofenu w środowisku zasadowym. Prosty dwuetapowy kinetyczny model, zakładający przekształcenie jednego enancjomeru w drugi poprzez nieaktywną optycznie enolową formę przejściową, nie mógł oscylacyjnego przebiegu zjawiska wyjaśnić, ponieważ nie spełniał on kryteriów takiej niestabilności. Pewien postęp w tej dziedzinie dokonał się dzięki współpracy z zespołem Prof. I. Epsteina z *Brandeis University* (USA). Zgodnie z rozszerzonym mechanizmem kinetycznym, proces inwersji chiralnej został zilustrowany schematem 1 na s. 49, który wprowadza procesy kondensacji równoległe do procesów inwersji. Opracowany model kinetyczny wprowadził możliwość oligomeryzacji prekursora P do krótkiego oligomeru E, który z kolei może ulegać agregacji do większego obiektu M. Niezbędne dla uzyskania niestabilności sprzężenie zwrotne zostało wprowadzone przez postulat autokatalitycznego tworzenia agregatu M, równoległe z drogą niekatalizowaną. Dla celów opisu kondensacji o oscylacyjnym przebiegu jej charakterystyk, poprzednio stworzony model kinetyczny został rozbudowany poprzez dodanie drugiego aminokwasu, z utrzymaniem idei tworzenia oligomerów i większych agregatów oraz z uwzględnieniem katalizy krzyżowej, polegającej na katalizowaniu tworzenia agregatu M_2 (tworzonego przez aminokwas 2) przez M_1 i vice versa.

Niestety zapisy tych mechanizmów w rozprawie (s. 47, s. 51), podobnie jak w oryginalnych publikacjach, nie są dla mnie dostatecznie jasne, ponieważ nie pokazują, jak należy przełożyć postać równań chemicznych dla każdego etapu na zapis różniczkowych równań kinetycznych, poza fragmentaryczną informacją na ten temat. Na przykład, jeśli równanie tworzenia oligomeru ma postać $n_1P \rightarrow E$, a równanie kinetyczne opisuje szybkość tego procesu jako k_0P , to powstaje pytanie o powód przyjęcia jednostkowego wykładnika potęgi dla stężenia P. Co oznacza wtedy współczynnik n_1 tej reakcji – zapewne nie jej molekularność, lecz liczbę cząsteczek peptydu P w oligomerze E. Ale wtedy w jaki sposób pojawia się w modelu parametr n_1 , a także n_2 sięgający wartości 8, a nawet 20? Żadne z cząstkowych równań kinetycznych (11-14) nie zawiera tych parametrów n_1 i n_2 – gdzie zatem pojawiły się one w procedurze numerycznej? Nawiasem mówiąc, zdanie na s. 47, brzmiące: „prowadzi do oscylacji o wartościach n_1 wynoszących co najmniej 20 itd.” jest nieprecyzyjne, ponieważ to nie wartości n_1 i n_2 oscylują, lecz są raczej stałym parametrem w danej symulacji, tak jak ilustruje to



zestawienie parametrów w Tabeli 4 na s. 52. Bez napisania pełnego układu równań kinetycznych użytych do symulacji oscylacji przedstawionych na rys. 16 (a dotyczących zapewne oligomeru E?) nie sposób ich odtworzyć.

Rozdział 6: „Badanie samoorganizujących się peptydów w mikro- i nanostrukturach”, ze względu na swoją zawartość powinien raczej nosić tytuł „Samoorganizowanie się peptydów w mikro- i nanostrukturach i metody ich badania”. Tym niemniej sama treść tego rozdziału jest interesująca. Niezręczne jest jednak używanie sformułowania: „ekstremalnych warunków, jak temperatura czy też ciśnienie”, ponieważ ekstremalne mogą być ewentualnie jedynie WARTOŚCI tych parametrów. Sformułowanie na s. 55, iż elektrony „dają krótsze fale niż światło widzialne” jest także nieprecyzyjne zarówno w odniesieniu do opisu fal materii de Broglie’a, jak i natury fal elektromagnetycznych.

W podsumowaniu recenzji części literaturowej uważam dobór materiału i jego kompozycję za ogólnie prawidłowe, z opisanymi wyżej zastrzeżeniami dotyczącymi przede wszystkim charakterystyki dynamiki oscylacyjnej.

Część rozprawy poświęcona **badaniom własnym** Doktorantka rozpoczyna od jednoznacznego określenia celów swojej pracy, które sprowadzają się do badania, za pomocą odpowiednich metod pomiarowych, wybranych aminokwasów pod kątem ich tendencji do ulegania niemonotonicznym zmianom strukturalnym, określanym w pracy jako samorzutna inwersja chiralna, z jednoczesną tendencją do kondensacji.

W spisie odczynników i materiałów podany jest m. in. zestaw badanych aminokwasów: L-cysteina, DL-cysteina, L-fenylalanina, D-fenylalanina, L-hydroksyprolina, L-metionina, L-fenylglicyna. Jest to istotne dla podkreślenia, że stosowany równolegle przez drugą Doktorantkę, p. mgr A. Godziek, zestaw aminokwasów nie był tożsamy z podanym wyżej, o czym już wspominałem. Proponuję jednak sprawdzić, czy podany w Tabeli 7 siarczan miedzi(II) był naprawdę siedmiowodny. Nie znam diagramu fazowego hydratów CuSO_4 , który uwzględniałby stopień uwodnienia większy niż dla pentahydratu. Co więcej, firma POCH, która według Tabeli 7 miałaby być producentem tego odczynnika, w swoim katalogu ma jedynie pięciowodny i bezwodny CuSO_4 .

W części tej zawarte jest także szczegółowe zestawienie metod eksperymentalnych, z przypisaniem do nich odpowiednich aminokwasów i rozpuszczalników. Poza technikami chromatograficznymi podany jest tu także syntetyczny opis warunków pomiarów polarymetrycznych, turbidymetrycznych i próby biuretovej. Mam jednak pytanie o szczegóły eksperymentów turbidymetrycznych, które nasuwa się przy czytaniu dalszej części pracy. Na osi rzędnych rysunku 48 odłożone są bowiem wielkości określone terminem „Nephelometric turbidity units”. Czy zatem była to, ściśle rzecz biorąc, turbidymetria (tzn. pomiar natężenia światła przechodzącego przez próbkę), czy nefelometria (pomiar światła rozproszonego pod pewnym kątem, np. 90°)?

Trzeba podkreślić, że Doktorantka włożyła wiele pracy w przeprowadzenie wielu, niekiedy długotrwałych eksperymentów i interpretację ich wyników. Są one niekiedy dość zaskakujące. Cienkowarstwowa chromatografia świeżo sporządzonego roztworu L-metioniny wykazuje dominację enancjomeru D, tak jakby inwersja chiralna była procesem bardzo szybkim i do tego przekraczającym asymptotyczną, wydawać by się mogło, granicę, jaką jest skład racemiczny. Co więcej, zgodnie z dalszymi badaniami, stężenie enancjomeru D następnie zmalało, aby po 5 miesiącach znów wzrosnąć. Jeśli jest to wynik wiarygodny, na który nie wpłynęła np. metoda badawcza, mechanizm tego zjawiska nie może być trywialny, w tym sensie, że przemiana jednego enancjomeru w drugi nie może być prostym i jedynym procesem. W moim przekonaniu peptyzacja aminokwasów o odpowiednio niestabilnej dynamice jest dla wyjaśnienia tych obserwacji rzeczywiście kluczowa, w tym poprzez tworzenie enancjomeru D na drodze rozpadu peptydów. Co jednak oznacza zdanie na s. 74 o „nieliniowym charakterze inwersji chiralnej”?



Interpretacja pomiarów polarymetrycznych z rys. 25 jest zapewne trudniejsza, ponieważ pomiar ten dostarcza informacji o wypadkowej czynności optycznej roztworu, pochodzącej od różnych obiektów optycznie czynnych, w tym zapewne tworzących się peptydów. Proponowana interpretacja odnosi się tylko do L-Met. Czy można pomijać peptydy w interpretacji dość drobnych zmian (rys. 26) skręcalności optycznej? Czy musi to być zatem ilustracja wyizolowanego z zespołu przemian samego tylko procesu inwersji chiralnej? Cenne są tu opisane na s. 80 wyniki badań metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, wykazujące pojawianie się i zanikanie pików pochodzących od produktów kondensacji, a badania za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) nie pozostawiają wątpliwości co do tworzenia dyskowych w tym przypadku struktur peptydowych. Zarazem prowokuje to pytanie o wpływ, jaki ewidentna niehomogeniczność układu, w którym pojawiła się dyskretna, rozproszona faza stała, mogła mieć na wyniki pomiarów, choćby turbidymetrycznych, których niemonotoniczny przebieg mógł być wynikiem nie tylko chemicznej dynamiki oscylacyjnej, ale i bardziej losowej w przebiegu, lokalnej nukleacji fazy stałej. Innymi słowy, powstaje pytanie, w jakim stopniu obserwowane niemonotoniczności są miarą lokalnej zmiany stanu układu, a w jakim – uśrednioną odpowiedzią układu jako całości. Analogiczne badania dla L-cysteiny mogą sprowokować podobne pytania, a analiza rysunku 43, na którym zaznacza się pewna periodyczność stopnia zmętnienia roztworu tego aminokwasu z okresem niemal dokładnie równej 1 dobie, każe zastanowić się nad tym, czy na mierzone parametry roztworu nie miał wpływu jakikolwiek czynnik zmieniający się w ciągu dnia, np. oświetlenie lub temperatura. Z jakiego bowiem powodu jakikolwiek aminokwas, nie będący przecież żywym organizmem, a tym bardziej różne aminokwasy miałyby wykazywać wspólny i akurat dobowy rytm zmian? Jednak i tym razem badania SEM jednoznacznie pokazują tworzenie peptydowej fazy stałej.

Opisane powyżej syntetyczne wyniki eksperymentów stanowiły wystarczającą podstawę do przeprowadzenia obliczeń numerycznych, we współpracy z Prof. I. Epsteinem. Kluczowy dla niestabilności etap (34), określony jako katalizowana agregacja, mógłby właściwie być nazwany AUTOkatalityczną agregacją, ponieważ C katalizuje swoje powstawanie. Tak jak opisałem to w części teoretycznej, podtrzymuję i w tym miejscu moje zastrzeżenia co do niepełnego i przez to niejasnego opisu procedury numerycznej, w której muszą się pojawić stopnie agregacji n_1 (dla monomerów tworzących peptydy) i n_2 (dla peptydów tworzących agregaty C). Nie sądzę też, aby model w sposób jawny opisywał wytrącanie się fazy stałej – powstaje jedynie faza C, równoważna fazie stałej w eksperymencie, ale konstrukcja modelu odpowiada, w moim przekonaniu, układowi homogenicznemu. Nie ma to znaczenia dla wzbudzenia dynamiki oscylacyjnej w modelu, ale interpretacja wyników eksperymentalnych, które mogą wykazywać szum związany z nukleacją fazy stałej, powinna ten efekt, tak jak wspomniałem wyżej, brać poważnie pod uwagę. Tym niemniej wprowadzenie do modelu etapów tworzenia i rozpadu struktur peptydowych uczyniło go zbliżonym do wyników eksperymentalnych. Odpowiednio wymodelowaną dynamikę oscylacyjną pokazuje rys. 45. Wprowadzenie skokowej funkcji Heaviside'a można uznać za pewną abstrakcję matematyczną w chemicznym modelu kinetycznym, ale analogiczne postępowanie było już w przeszłości stosowane w opisie dynamiki oscylacyjnej, m. in. towarzyszącej procesom pasywacji i depasywacji elektrod stałych. W tej części tekstu daje się jednak zauważyć błąd w nazwisku Heaviside'a, a określenie argumentów jego funkcji jest beztróskim przełożeniem angielskich terminów na język polski: argument pozytywny to po prostu liczba dodatnia, a argument negatywny to liczba ujemna. Nazwisko Lieseganga także zawiera błąd.

Tę część pracy zamyka syntetyczny opis analogicznych pomiarów dla enancjomerów i racematu fenyloalaniny, głównie za pomocą techniki HPLC i turbidymetrii, ujawniającej znów intrygujący quasi-dobowy rytm zmian zmętnienia dla D-fenyloalaniny, przy jednoczesnym braku takiej periodyczności (poza pewnym szumem) dla enancjomeru L. Zmiany zmętnienia dla racematu są



niemal monotoniczne, co potwierdza szczególną dynamikę, jakiej ulegają tylko czyste enancjomery na drodze ku mieszaninie racemicznej.

Ważna, druga część własnych badań dotyczy analogicznej analizy roztworów zawierających dwa różne aminokwasy, w których zatem mogły powstawać, obok homopeptydów, także heteropeptydy. Zastosowanie metody HPLC, prowadzące do wyników przedstawionych na rys. 51, pozwoliło na śledzenie czasowej dynamiki stężeń L-Phe, L-Hyp i sygnału przypisywanego produktowi polikondensacji. Logicznie rozumując, jeśli produkt ten jest polikondensatem L-feniloalaniny i L-hydroksyproliny, wzrost jego stężenia powinien być ściśle skorelowany z jednoczesnym obniżeniem stężenia (wysokości sygnałów) monomerów L-Phe i L-Hyp. Analiza rys. 51 pokazuje jednak przebiegi raczej zgodne w fazie dla wszystkich 3 postulowanych form. Co prawda rys. 52 pokazuje przeciwnie w fazie przebiegi, ale dla bardzo wąskiego przedziału czasowego i zaledwie dla 3 kolejnych punktów pomiarowych. W moim przekonaniu interpretacja sygnałów na rys. 51, w szczególności w odniesieniu do założenia o produkcie kondensacji monomerów, wymaga dalszej analizy. Nie ulega przy tym wątpliwości, że peptyd lub peptydy powstały – dowodzą tego i spektrochromatogram, pokazany na rys. 53 i chromatogramy oraz widma mas, zaprezentowane na rys. 54.

Interesującym wzbogaceniem opisanych w tej części badań jest wprowadzenie L-cysteiny, która poprzez możliwość tworzenia mostków disulfidowych ma wpływ na kształt struktur peptydowych, sprzyjając ich sferycznym kształtom, a więc innym niż w układach opisanych wcześniej. Nawiasem mówiąc, użyte na s. 108 pojęcie struktur kulistych/sferycznych zawiera dwa określenia będące w istocie względem siebie synonimami. Bardzo przekonujące są wyniki badań SEM, zestawione w formie mikrografii na rys. 56 i 57, pokazujące morfologie struktur peptydowych dla czystej cysteiny, feniloalaniny i fenyloglicyny oraz dla par L-Cys – L-Phe i L-Cys – L-Phg, powstających w ciągu kilku tygodni. Oczywiście było zastosowanie następnie metody HPLC do scharakteryzowania dynamiki czasowej tych układów, w których potwierdzono tworzenie wiązań peptydowych. W badaniach tych ujawnił się także sygnał pochodzący od kwasu cysteinowego, uznanego za produkt utleniania cysteiny. Interesujące jest osiąganie przez układ, np. L-Cys – L-Phg wzajemnej synchronizacji w przebiegu pików chromatograficznych, sugerującej wzajemną (krzyżową) katalizę tych aminokwasów, postulowaną w opisanym wyżej modelu kinetycznym, co stanowi istotne potwierdzenie jego chemicznej realności. Kolejnym dowodem tworzenia homo- i heteropeptydów w tych układach stały się wyniki badań metodą spektrometrii mas. Badania turbidymetryczne układów L-Cys – L-Phe i L-Cys – L-Phg wykazały przebiegi czasowe zmętnienia różniące się nawet nachyleniem, co zapewne wymaga jeszcze interpretacji, ale nie jest ona tak istotna dla opisu mikroskopowej dynamiki układów, jak bardziej selektywne, opisanie wyżej metody. Wreszcie ostatecznym dowodem tworzenia peptydów w obu układach stały się pozytywne wyniki próby biuretowej.

Podsumowując powyższe omówienie kwestii merytorycznych, za zasadniczą wartość pracy uważam uzyskanie bogatego materiału eksperymentalnego, który dowodzi powstawania stałych faz peptydów, z uwzględnieniem ich, zależnej od budujących je aminokwasów, różnorodnej morfologii i uzasadnia hipotezę o istotnej roli dynamiki powstawania i rozpadu agregatów peptydowych w obserwowanych niemonotonicznych zmianach charakterystyk roztworów aminokwasów. W moim przekonaniu, choć zjawiska te nie są jeszcze w pełni zrozumiane, to właśnie wprowadzenie do rozważań autokatalitycznej dynamiki peptydowej fazy stałej stanowi istotny krok w kierunku sformułowania realnego chemicznie mechanizmu niestabilności. Trzeba pamiętać, że dynamika oscylacyjna jest wynikiem na przemian dominujących dodatnich i ujemnych sprzężeń zwrotnych i bez identyfikacji procesów za to odpowiedzialnych trudno mówić o wyjaśnieniu tego typu zjawisk.



Zarazem ponawiam wyrażoną powyżej sugestię zastanowienia się nad tym, w jakim stopniu niemonotoniczność zmian niektórych charakterystyk badanych układów dynamicznych może być spowodowana losową nukleacją i agregacją fazy stałej, tworzącej zatem układ heterogeniczny, o charakterystyce zależnej zatem nie tylko od czasu, ale i od aktualnie analizowanego miejsca układu.

Od strony formalnej rozprawa jest zredagowana starannie, choć jej lektura ujawnia pewne usterki i niezręczności, w praktyce niełatwe jednak do uniknięcia w pracy o tak znacznej objętości. Nie ma potrzeby, aby wszystkie je wyliczać, ograniczę się więc do wybranych, dodatkowych uwag. Użyty na s. 17 niepoprawny czasownik „syntezować” powinien być zastąpiony przez poprawny „syntetyzować”, należy też unikać (s. 18) bardzo popularnego, ale także niepoprawnego zwrotu „w oparciu o.”, zamieniając go na poprawne „opierając się na” lub „na podstawie”. Nieco zagadkowe jest także zdanie na s. 20, mówiące, iż „badania nad stereochemią związków rozwijały się stopniowo, acz powoli”. Dla ścisłości języka chemicznego warto zaznaczyć, że (s. 27), to nie cyklodekstryny, a cząsteczki cyklodekstryn przypominają kształtem stożek. Na s. 28 symbole jonów powinny zawierać stopień utlenienia scalony z symbolem pierwiastka, czyli Cu(II), a nie Cu (II). W zdaniu na s. 30, mówiącym, iż „faza ruchoma odgrywa tutaj ważny parametr w optymalizacji środowiska chiralnego rozdzielania” słowo „odgrywa” powinno zostać zastąpione przez „stanowi”, a poza tym faza nie jest raczej parametrem. Poprawy wymaga składnia w zdaniu na s. 35 – „Chcąc stosować technikę spektrometrii mas największy problem stanowiło przeprowadzenie cząsteczek...”. Zastrzeżenia budzi sposób zapisu równań chemicznych i odpowiadających im równań matematycznych (różniczkowych) na s 43, 44, 47, 97 i 98. Zgodnie z powszechnie dziś przyjętą konwencją, przestrzeganą przez redakcje poważnych czasopism naukowych, symbole substancji chemicznych i operatorów matematycznych (tu: pochodnej funkcji) powinny być pisane czcionką prostą, a symbole zmiennych (stężeń, czasu, współrzędnych przestrzennych – kursywą). To tylko pozornie przesadne zalecenie bardzo ułatwia interpretację - szczególnie złożonych - równań matematycznych.

W konkluzji – na podstawie analizy rozprawy, w zestawieniu z załączonymi oświadczeniami Doktorantki i współautorów publikacji, wyrażam przekonanie, że przedstawiona do recenzji praca, mimo pewnych niedociągnięć dotyczących głównie krótkiego i nie w pełni poprawnego opisu dynamiki oscylacyjnej w części teoretycznej, zawiera istotne elementy nowości naukowej, a zatem spełnia urzędowe wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami), a także zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę więc o dopuszczenie Pani mgr Anny Łągiewki do dalszych etapów postępowania w procedurze uzyskiwania stopnia naukowego doktora.

Prof. dr hab. Marek Orlik