

ul. F. Joliot-Curie 14
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 74 75

www.chem.uwr.edu.pl

prof. dr hab. Paula Gawryszewska-Wilczyńska

e-mail: paula.gawryszewska-wilczynska@uwr.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Nadziei Grzyb

pt. „Free radical reactions of sulfur-containing amino acids and peptides. From reactive transients to stable products”

Pani mgr inż. Katarzyna Nadzieja Grzyb przedstawiła do oceny rozprawę doktorską zatytułowaną „Free radical reactions of sulfur-containing amino acids and peptides. From reactive transients to stable products”, wykonaną w Zakładzie Chemii Fizycznej i Fotochemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Tomasza Pędzińskiego, prof. UAM.

Rozprawa została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu pięciu artykułów, opublikowanych w latach 2020-2024 (pozycje oznaczone symbolami P1, P2, P3, P4, P5 w rozdziale 2), uzupełnionego o wyczerpujące omówienie w języku angielskim. Taka forma rozprawy jest zgodna z wymogami formalnymi, określonymi w art. 13 pkt. 2 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wyniki zostały opublikowane w czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej o wysokiej renomie wśród czasopism w obszarach fotochemii i spektroskopii (współczynnik wpływu czasopisma w roku publikacji wynosi od 2.991 do 6.208).

Rozprawa doktorska zawiera 87 stron omówienia w języku angielskim oraz dołączone publikacje wraz z materiałami pomocniczymi. Obejmuje: streszczenie w języku angielskim i polskim; wprowadzenie (rozdział 1 – 31 stron); cel pracy i listę pięciu artykułów (rozdział 2 - 2 strony); dyskusję wyników, podsumowanie i wnioski (rozdział 3 – 17 stron); bibliografię zawierającą 89 odnośników literaturowych; spis rysunków i schematów; spis tabel; wykaz osiągnięć (publikacje, granty, staże zagraniczne, wystąpienia konferencyjne i nagrody); kopie oświadczeń współautorów. Doktorantka jest współautorką 9 publikacji (w tym pięciu prac bezpośrednio związanych z pracą doktorską), wyniki prezentowała na 5 konferencjach, kierowała jednym projektem badawczym (finansowanie IDUB), odbyła dwa staże zagraniczne,

jest laureatką 3 konkursów IDUB. Według bazy naukowej *Web of Knowledge* z dnia 5.07.2025 prace były cytowane 38 razy, a *indeks Hirscha* mgr inż. Katarzyny Grzyb wynosi 4. Dane bibliometryczne są wystarczające do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Pani mgr inż. Katarzyna Grzyb określiła swój wkład autorski i zostało to potwierdzone przez współautorów w załączonych oświadczeniach. W dwóch najwcześniejszych pracach pierwszym autorem jest Promotor, następnie w trzech kolejnych trójautorskich Doktorantka, która była odpowiedzialna za: naświetlenia stacjonarne, czasowo-rozdzielcze pomiary spektroskopowe (nanosekundowa fotoliza błyskowa), analizę wyników wysokosprawnej chromatografii cieczowej, opracowanie i interpretację wyników eksperymentalnych, przygotowanie schematów, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu i odpowiedzi do recenzentów. Wkład autorski Doktorantki jednoznacznie określa jej kluczową rolę w powstaniu manuskryptów.

Zainteresowania Doktorantki obejmują mechanizmy utleniania aminokwasów i peptydów zawierających atom siarki. Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna i wpisuje się w ogólnoswiatowe badania procesów utleniania peptydów i białek, które prowadzą do wielu schorzeń, w tym neurodegeneracyjnych, oraz wpływają na procesy starzenia. Badania podjęte przez Doktorantkę są niezwykle istotne ze względu na wciąż trwającą dyskusję naukową dotyczącą zrozumienia mechanizmów utleniania w rzeczywistych układach biologicznych, w których wewnątrzcząsteczkowe przemiany rodnikowe z udziałem utlenionego centrum siarkowego w resztach metioninowych odgrywają kluczową rolę.

Dysertacja mgr inż. Katarzyny Grzyb dotyczy analizy produktów przejściowych i trwałych powstałych w wyniku reakcji utleniania biomimetycznych układów modelowych aminokwasów z grupą sulfidową (Ac-Met-NH-CH₃, Ac-MeCys-NH-CH₃, Ac-Met-OCH₃, Ac-Met, Ac-MeCys). Utlenianie jest fotosensybilizowane przez 3-karboksybenzofenon (3CB) oraz indukowane radiolitycznie, gdzie utleniaczem jest rodnik hydroksylowy. Układy modelowe i fotosensybilizator zostały dobrane odpowiednio, możliwe było tworzenie wiązań (S:S)⁺, (S:O)⁺ lub (S:N)⁺, a widma absorpcji rodników pochodnych 3CB nie pokrywały się z absorpcją indywiduów przejściowych generowanych przez utlenianie metioniny. Czasowo-rozdzielcza laserowa fotoliza błyskowa (LFP) oraz radioliza impulsowa (PR) pozwoliły na śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym w skali czasowej nano- i mikrosekundowej (charakterystyka krótko żyjących produktów przejściowych). Natomiast wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) umożliwiło identyfikację produktów trwałych. Połączenie tych komplementarnych metod pozwoliło określić wpływ struktury substratu i warunków reakcji na powstałe produkty pośrednie oraz trwałe modyfikacje badanych związków.

Struktura recenzowanej dysertacji jest prawidłowa. Streszczenie w zwięzły i jasny sposób zapoznaje z założeniami i celem rozprawy doktorskiej, metodologią pracy, najważniejszymi wynikami i nowością naukową prowadzonych badań.

W rozdziale 1 (Wprowadzenie) omówione są: i) właściwości aminokwasów zawierających atom S (metionina, cysteina) ze szczególnym uwzględnieniem ich oksydacyjnych modyfikacji w białkach i biologicznych konsekwencji tego procesu (podrozdziały 1.1-1.3); ii) istotna rola metioniny w mechanizmach utleniania/redukcji β -amyloidu (podrozdział 1.2.1); iii) porównanie fotofizycznych właściwości różnych fotosensybilizatorów ze wskazaniem na związki, których wykorzystanie do badań białek zawierających metioninę przy zastosowaniu techniki absorpcji przejściowej jest bardzo korzystne (podrozdział 1.4); iv) etapy fotosensybilizowanego utleniania metioniny i metylcysteiny w warunkach beztlenowych (podrozdziały 1.5, 1.6); v) etapy indukowanego radiolitycznie utleniania metioniny (porozdział 1.7); vi) procesy tworzenia produktów trwałych w wyniku fotosensybilizowanego i radiacyjnego utleniania metioniny (podrozdział 1.8); vii) przegląd literaturowy dotyczący fotosensybilizowanego i radiacyjnego utleniania metioniny i jej pochodnych z uwzględnieniem wydajności kwantowej indywiduów przejściowych (podrozdział 1.9); viii) metodologia (podrozdział 1.10). Rozdział 1 wskazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w temacie mechanizmów reakcji rodnikowych w układach o znaczeniu biologicznym oraz różnych technikach eksperymentalnych pozwalających na ich badanie. Wprowadzenie zostało opracowane w oparciu o odpowiednio dobrane pozycje literaturowe. Moim zdaniem rozdział 1 doskonale wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy i zapoznaje go z dotychczasowym stanem wiedzy.

W rozdziale 2 Doktorantka przekonująco uzasadnia wybór tematu badawczego, przedstawia cel i zadania rozprawy oraz zakres prowadzonych badań. Zwraca jedynie uwagę drobna nieścisłość w stosunku do streszczenia, w którym Doktorantka wspomina o poznaniu mechanizmów utleniania pochodnych metioniny, natomiast w rozdziale 2 wspomina o aminokwasach zawierających grupę sulfidową. Cel i zadania badawcze uważam za ambitne, dobrze sprecyzowane i uzasadnione naukowo.

Publikacje wchodzące w skład dysertacji zostały omówione w rozdziale 3, w kolejnych podrozdziałach o tytułach odpowiadających tytułom artykułów (podrozdziały 3.1-3.5). Doktorantka opisuje w nich najważniejsze wyniki i wnioski. Rozdział 3 zawiera również podsumowanie i wnioski (podrozdział 3.6). W podrozdziale 3.1 opisano analizę indywiduów przejściowych i trwałych produktów powstałych w wyniku fotoredukcji benzofenonu, 3-karboksybenzofenonu (3CB) i 4-karboksybenzofenonu (4CB). Określono struktury produktów fotopinakolizacji oraz izomerycznych rodnikowych adduktów sprzęgania krzyżowego odpowiednich rodników difenyloketylowego i dimetyloketylowego powstałych w wyniku reakcji przeniesienia atomu wodoru (HAT) pomiędzy sensybilizatorami a 2-propanolem. Omówiono

również mechanizmy reakcji. Podrozdział 3.2 dotyczy mechanizmów fotosensybilizowanego utleniania analogów metioniny (N-Ac-Met-NH-CH_3) i metylocysteiny (Ac-MeCys-NH-CH_3) przez wzbudzony triplet 3-karboksybenzofenonu ($^3\text{3CB}^*$) w obojętnych roztworach wodnych. Przeanalizowano różnice zaobserwowane dla fotoreakcji pierwotnych i wtórnych. Badane związki imitują zachowanie metioniny i metylocysteiny w peptydach. Podrozdział 3.3 poświęcony jest szczegółowym badaniom mechanizmów utleniania peptydomimetyku (ester metylowy acetylometioniny (Ac-Met-OMe)) przy wykorzystaniu radiolizy impulsowej oraz laserowej fotolizy błyskowej. Określono produkty przejściowe i trwałe oraz zaproponowano ścieżki i mechanizmy powstawania produktów utlenienia reszty Met. Podrozdział 3.4 dotyczy procesu fotoutleniania biomimetycznego modelu C-końcowej metioniny, N-Acetylo-Metioniny (N-Ac-Met), sensybilizowanej przez wzbudzony triplet 3-karboksybenzofenonu ($^3\text{3CB}$) w obojętnych i zasadowych roztworach wodnych. Określono mechanizm procesu oraz wydajności kwantowe konkurencyjnych reakcji dekarboksylacji i deprotonacji rodnika siarkowego N-Ac-Met . W podrozdziale 3.5 przeprowadzono analizę całościowego mechanizmu utleniania acetylometylocysteiny (Ac-MeCys) przy wykorzystaniu $^3\text{3CB}$ jako fotosensybilizatora.

Szczególnie wysoko oceniam podrozdział 3.6, który zawiera podsumowanie i wnioski. Doktorantka w zwięzły sposób przedstawia najważniejsze osiągnięcia podkreślając jednocześnie istotną rolę analizy wszystkich trwałych produktów w wyjaśnieniu mechanizmu reakcji wolnorodnikowych aminokwasów zawierających siarkę. Podrozdział ten stanowi kompendium dysertacji opisując jej istotę oraz ważność poruszanych problemów.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w rozprawie doktorskiej zaliczam:

- Wkład w badania nad fotochemicznymi reakcjami sensybilizatorów: benzofenonu oraz jego rozpuszczalnych w wodzie pochodnych (3-karboksybenzofenonu i 4-karboksybenzofenonu). Analiza ta daje wgląd w rolę benzofenonu i jego pochodnych w mechanistycznych szlakach biologicznie istotnych procesów oraz pokazuje potencjał badań nad trwałymi produktami reakcji wolnorodnikowych cząsteczek o znaczeniu biologicznym.
- Wykazanie, że niewielka zmiana w strukturze aminokwasu zawierającego siarkę prowadzi do znaczących zmian w mechanizmach fotosensybilizowanego utleniania (N-Ac-Met-NH-CH_3 i Ac-MeCys-NH-CH_3) przez $^3\text{3CB}^*$ w roztworach wodnych o pH obojętnym.
- Opracowanie szczegółowych schematów ścieżek i mechanizmów utleniania peptydomimetyku (ester metylowy acetylometioniny) przy użyciu technik czasowo-rozdzielczych radiolizy i fotolizy. Badania te stanowią punkt odniesienia dla identyfikacji, kwantyfikacji i mechanistycznego określania produktów pochodzących z utleniania pochodnych Met i stanowią znaczący wkład w zrozumienie mechanizmów utleniania w

rzeczywistych układach biologicznych mających zastosowanie w badaniach nad terapiami białkowymi.

- Określenie mechanizmu fotoutleniania biomimetycznego modelu C-końcowej metioniny, N-Ac-Met, co daje wgląd w szlaki reakcji wolnorodnikowych biologicznie istotnej reszty metioniny, która imituje Met35 w C-końcowej domenie β amyloidu. Wyniki te są istotne ze względu na potrzebę wyjaśnienia mechanizmów prowadzących do nieodwracalnych modyfikacji i uszkodzeń białka, które jest uważane za związane z patogenezą choroby Alzheimera.
- Określenie mechanizmu fotoutleniania Ac-MeCys oraz korelacji jak odległość między grupą tioeterową a szkieletem peptydu wpływa na mechanizm utleniania Ac-MeCys w porównaniu do Ac-Met.

Pracę doktorską czyta się bardzo dobrze, napisana jest w sposób logiczny, a wnioski sformułowane są precyzyjnie, co świadczy o dojrzałości naukowej Pani mgr inż. Katarzyny Nadziei Grzyb. Wyniki prezentowane w rozprawie zostały opublikowane w renomowanych czasopismach a zatem przeszły przez krytyczne oceny recenzentów.

Rozprawa doktorska przygotowana została bardzo starannie, zawiera pojedyncze błędy edytorskie np. na str. 45 w ostatnim akapicie zamiast Figure 14 powinno być Figure 13.

Pani mgr inż. Katarzyna Nadzieja Grzyb skupiła się w swojej dysertacji na beztlenowym jednoelektronowym utlenianiu aminokwasów zawierających siarkę, które mają wiązania peptydowe i imitują zachowanie aminokwasów w złożonych strukturach białkowych. Jak napisała Doktorantka celem pracy było dogłębne poznanie i uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat mechanizmów utleniania pochodnych metioniny przy wykorzystaniu biomimetycznych układów modelowych. Czy w kontekście prowadzonych badań interesujące byłoby określenie mechanizmu dwuelektronowego utleniania Met w obecności tlenu dla biomimetycznego modelu C-końcowej metioniny, która imituje Met35 w C-końcowej domenie β -amyloidu?

Patogeneza chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera, jest łączona ze zdolnością amyloidowego β -peptydu do inicjacji procesów wolnorodnikowych. Są doniesienia literaturowe, że procesy rodnikowe mogą zachodzić z udziałem obecnej w organizmie Cu(II) kompleksowanej przez β -amyloid. Badania były/są często prowadzone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii jonowykluczającej, spektroskopii rezonansu paramagnetycznego oraz spektroskopii UV-Vis. Czy użycie metod/metody stosowanych w pracy doktorskiej mogłoby przyczynić się do uzyskania nowych informacji dotyczących procesów rodnikowych z udziałem Cu(II) kompleksowanej przez β -amyloid?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr inż. Katarzyny Nadziei Grzyb zawiera wiele wartościowych i interesujących wyników badań oraz osiągnięć, które stanowią nowość naukową w zakresie zrozumienia mechanizmów utleniania i nieodwracalnych modyfikacji białek. Założony cel rozprawy został w pełni zrealizowany.

Nieliczne uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Katarzyny Nadziei Grzyb. Stwierdzam, że spełnia ona wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20.07.2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 tj. z dnia 2023.04.20) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Katarzyny Nadziei Grzyb do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wartość otrzymanych wyników, ich aktualność oraz wysoki poziom nowości naukowej stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

P. J. J. J.