

Toruń, dnia 10 listopada 2015 r.

dr hab. Renata Gadzala-Kopciuch, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel
pt. *„Chromatograficzne badania tiazolidynowych i tiazynowych
pochodnych endogennych aldehydów”*

Podjmując się oceny recenzji pracy doktorskiej realizowanej w grupie badawczej dr hab. Rafała Głowackiego, prof. UŁ, kierowałam się dużym zainteresowaniem i ciekawością odnośnie postępów w analityce związków tiolowych. Pani mgr Monika Wyszczelska-Rokiel przedłożyła pracę doktorską dotyczącą *„Chromatograficznych badań tiazolidynowych i tiazynowych pochodnych endogennych aldehydów”*. Realizowane w ramach tej pracy badania ściśle wpasowują się w tematykę badawczą Promotora, która została zapoczątkowana w Katedrze Chemii Środowiska kierowanej wówczas przez prof. dr hab. Edwarda Balda i jest stale rozwijana oraz doskonalona poprzez wprowadzanie nowych odczynników do derywatyzacji. Osiągnięcia tego Zespołu są bardzo pozytywnie odbierane w środowisku naukowym analityków.

Identyfikacja endogennych aminokwasów tiolowych, to ogromne wyzwanie dla badaczy chociażby ze względu na dodatkowy krok w postępowaniu analitycznym - konieczność przeprowadzania substancji w pochodne, czyli wprowadzenie procesu derywatyzacji. Niezbędna jest w tym przypadku szeroka wiedza na temat właściwości samych analitów i odczynników derywatyzujących oraz przestrzeganie rygoru analitycznego w postępowaniu zwłaszcza z próbkami biologicznymi. To istotny krok w metodyce prowadzonych badań w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie dotyczące powstawania tiazyn i tiazolidyn w organizmach żywych w wyniku reakcji aminokwasów tiolowych z endogennymi aldehydami. Podjęta w pracy problematyka badawcza jest interesująca zarówno z punktu widzenia analitycznego, jak i poznawczego zwłaszcza, jeżeli chodzi o poszukiwanie związku powstających adduktów ze schorzeniami neurodegeneracyjnymi.

Praca doktorska Pani mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel skonstruowana jest w klasyczny sposób, czyli ma wyodrębnioną zwięzłą część literaturową (ta część obejmuje około 25 procent objętości pracy), opis wykonywanych doświadczeń, zestawienie uzyskanych wyników, ich dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz spis

odnośników literaturowych. Rozprawa została oparta na 176 pozycjach literaturowych, na które składają się głównie artykuły o obiegu międzynarodowym zamieszczone w fachowych czasopismach naukowych. To zbiór aktualnych osiągnięć innych ośrodków badawczych w obrębie poruszanej tematyki. Praca doktorska zwieńczona jest najważniejszymi osiągnięciami naukowymi Autorki. Całość pracy poprzedzona jest użytecznym wykazem skrótów zastosowanych w pracy oraz krótkim wstępem, jednak w obrębie tego jednostronicowego wprowadzenia można odnaleźć potwierdzenie istotności podjętych badań na tle dotychczasowych osiągnięć.

Część literaturową Autorka podzieliła na dwa rozdziały. W pierwszym z nich omówione zostały możliwości wykorzystania soli chinolinowych w procesie derywatywacji. Wyczerpująco zaprezentowała znaczenie derywatywacji chemicznej, jako często niezbędnego etapu w przygotowaniu próbek oraz zmiany właściwości fizykochemicznych analitów. Wrażenie robi wnikliwość z jaką Doktorantka omawia reakcje wybranych endogennych związków siarki z preferowanymi do tego odczynnikami derywatyzującymi – zwłaszcza z solami chinolinowymi. Można już na tym etapie zauważyć, że zarówno tematyka jaką podjęła w pracy doświadczalnej, jak i zagadnienia niezbędne do rozwiązywania napotkanych problemów są interesujące, ale wymagają wiedzy i zaangażowania do przeprowadzenia żmudnych eksperymentów. W obrębie tego rozdziału można znaleźć również charakterystykę fizykochemiczną soli chinolinowych oraz możliwości wykorzystania tych substancji do upochadniania związków siarki. Jest to istotna i niezbędna wiedza w celu przygotowania próbek z płynów ustrojowych, które ze względu na złożoność matrycy wymagają poznania oddziaływań pomiędzy składnikami matrycy a analitem oraz ogromnej rozwagi analityka podczas pracy z takim materiałem. Drugi, a zarazem ostatni rozdział tej części pracy Autorka poświęciła omówieniu znaczenia i analityce endogennych aminokwasów tiolowych. Można tu odnaleźć interesujące doniesienia literaturowe dotyczące oddziaływania endogennych aminokwasów tiolowych na organizm ludzki, gdzie brak równowagi w ich występowaniu może w konsekwencji prowadzić do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania układu krążenia, zmian neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona czy Alzheimer) czy innych niebezpiecznych dla naszego organizmu schorzeń. Jednoznacznie można stwierdzić, że istotność tych badań jest bardzo ważna w celu poznania mechanizmów rządzących rozwojem tych chorób. Kolejny podrozdział dotyczy innych biologicznie aktywnych pochodnych endogennych aminokwasów tiolowych, które powinny być brane pod uwagę podczas ustalania całkowitego bilansu tych związków w organizmie. Cennym dla analityka jest następny podrozdział, gdzie Pani mgr Monika Wyszczelska-Rokiel nakreśliła podstawowe trudności z oznaczaniem aminokwasów tiolowych w próbkach biologicznych.

Układ tej części pracy nie budzi większych zastrzeżeń, a omawiane w poszczególnych rozdziałach zagadnienia są przemyślane i jasno sprecyzowane. Jednak odwołując się do tematu pracy spodziewałabym się zaprezentowania możliwości wykorzystania technik chromatograficznych w połączeniu z różnymi sposobami detekcji oraz wykazana ich zalet i wad przy oznaczaniu związków tiolowych. Tylko zdawkowe informacje można odnaleźć w ostatnim podrozdziale, gdzie Autorka poświęciła jeden akapit i zacytowała tylko jedną pozycję literaturową (str. 40). Szkoda, że nie dokonała w tym zakresie bardziej wnikliwego rozeznania literaturowego, chociażby korzystając ze znacznych doświadczeń Zespołu naukowego Katedry Chemii Środowiska, w której realizowana była praca doktorska. Na podkreślenie zasługuje obszerny materiał źródłowy, z którym Autorka musiała się zapoznać i wnikliwie go przestudiować. Niewątpliwie, dzięki temu możliwe było sprecyzowanie celów pracy a zdobyta podczas tych studiów literaturowych wiedza tematycznie ściśle związana jest z zakresem części doświadczalnej mającej wpływ na zaplanowanie i przeprowadzenie badań.

Pochylając się nad wynikami i ich interpretacją można stwierdzić, że założone cele pracy zostały osiągnięte, co oznacza, że Autorka opracowała metodę pozwalającą na oznaczanie i identyfikację powstających tiazynowych i tiazolidynowych pochodnych w osoczu ludzkim z wykorzystaniem połączenia derywatyzacji chemicznej z chromatografią cieczową. Ten nadrzędny cel pracy wymagał zaplanowania i przeprowadzenia licznych badań związanych z reaktywnością endogennych aminokwasów tiolowych wobec aldehydu mrówkowego, octowego i fosforanu 5'-pirydoksalu w warunkach *in vitro* oraz w przypadku fosforanu 5'-pirydoksalu również w warunkach *in vivo*. Można zauważyć, że interpretacja uzyskanych wyników przeprowadzona jest z dużą ostrożnością, która świadczyć może o pełnej świadomości ryzyka popełnienia błędu. Ponadto, Autorka przeprowadziła syntezę odczynnika do derywatyzacji 7-acetyloamino-4-merkaptio-2,1,3-benzoksadiazolu proponując modyfikację na dwóch etapach jego otrzymywania (szkoda, że szerzej o tym nie wspomniano) i poddała uzyskany produkt charakterystyce fizykochemicznej w celu potwierdzenia struktury otrzymanego związku. Pozwoliło to na opracowanie kompleksowej procedury analitycznej od momentu przygotowania próbki z uwzględnieniem derywatyzacji chemicznej badanych analitów w osoczu, aż do ich końcowego, ilościowego oznaczenia za pomocą chromatografii cieczowej w połączeniu z detekcją spektrofotometryczną. Część doświadczalną pracy zakończyła Autorka zwięzłym, ale zarazem treściwym podsumowaniem przeprowadzonych badań oraz wnioskami wysnutymi na podstawie uzyskanych wyników.

Doświadczenia zrealizowane w ramach pracy doktorskiej zostały przedstawione w przejrzysty i klarowny sposób, który umożliwia śledzenie poszczególnych etapów badań i postępów w ich realizacji. Opracowane podczas prowadzonych

eksperymentów procedury analityczne (rozdział 3), zarówno związane z syntezą odczynnika derywatyzującego, jak i poszczególnych etapów badań są starannie przygotowane z uwzględnieniem wszystkich warunków, co zapewnia wiarygodność uzyskiwanych wyników i możliwość ich odtworzenia przez inne osoby. Nie jest moim zamiarem streszczenie przeprowadzonych badań, jednak należy podkreślić, że opis przeprowadzonych doświadczeń oraz dyskusja wyników, dowodzą rzetelności wykonanej pracy.

Pod względem redakcyjnym praca jest estetycznie i starannie przygotowana. Zamieszczone tabele i rysunki są czytelne a ich podpisy w większości przygotowane z przemyśleniem i w wyczerpujący sposób ujmujące prezentowane wyniki. Moje wątpliwości budzi używanie w przypadku analizy ilościowej wysokości piku a nie pola powierzchni pod pikiem, co nie jest w analityce stosowane. Prawie na wszystkich chromatogramach i zależnościach (zwłaszcza 42 i 43; str. 96 i 97) w części doświadczalnej na osi OY mamy naniesione wysokości piku. Na chromatogramach obserwuje się odpowiedź detektora w postaci intensywności sygnału. Praca ogólnie ujmując napisana jest poprawnym językiem bez zwrotów anglojęzycznych z nielicznymi niefortunnymi sformułowaniami np. : „*polepszenie detekcji*” (str. 14), „*wprowadzenie na kolumnę*” (str. 40), „*supernatant*” (str. 41), „*spadek piku*” (117), „*słaba pozytywna korelacja*” (str. 120), itp.

Na koniec chciałabym przedstawić kilka uwag i spostrzeżeń, które mają posłużyć jako przyczynek do dyskusji i nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę pracy, jednak obowiązkiem recenzenta jest o nich wspomnieć. Praca, jak wspomniano powyżej, napisana jest poprawnym językiem naukowym i bardzo precyzyjnie, jednakże brakuje w niej samodzielnych komentarzy, które niewątpliwie wzbogaciłyby pracę. Rozdział *Dyskusja wyników* powinien być połączony z wynikami, co czytającemu zapewniłoby komfort w pełnej analizie. Wydzielenie ich w osobnych rozdziałach powoduje chaos w ciągłym przewracaniu kartek w celu odnalezienia właściwego rysunku czy tabeli. Niezrozumiałe jest stosowanie w analizie ilościowej w przypadku chromatografii takiego parametru jak wysokość piku (str. 96, 97) oraz powielanie tych samych danych w formie wykresu i tabeli (str. 97). Wyjaśnienia wymaga też zależność stężenia adduktu cysteina↔fosforan 5'-pirydoksalu od stężenia cysteiny zamieszczona na rysunku 44 (str. 98). Współczynnik regresji jaki uzyskano dla tej zależności wynosi 0,1385, co wymaga wnikliwego komentarza, a nie lakonicznego stwierdzenia - „*słaba pozytywna korelacja*” (str. 120). Dlaczego pozytywna a nie dodatnia? Pomyłka chyba pojawiła się przy wartości LOQ dla tego adduktu, która wynosi 1 μmol/l (str. 120), gdzie zakres liniowości wyznaczony jest od 1-100 nmol/l.

Od strony formalnej, oceniając działalność publikacyjną Pani mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel należy podkreślić fakt, że uzyskane wyniki stały się podstawą do przygotowania trzech publikacji naukowych w czasopiśmie o obiegu

międzynarodowym w *Journal of Chromatography B* (IF=2,85), *Analytical Methods* (IF=1,82) i *Journal of the International Society of Sports Nutrition* (IF=1,91) oraz w polskim czasopiśmie Wiadomości Chemiczne. Ponadto, Pani mgr Monika Wyszczelska-Rokiel uczestniczyła jako współwykonawca przy projektach badawczych realizowanych w Katedrze. Do całkowitego dorobku naukowego należy zaliczyć liczne wystąpienia (4 referaty ustne, 11 prezentacji plakatowych) na konferencjach krajowych i zagranicznych. Oznacza to, że dokonania Doktorantki były już weryfikowane pod względem merytorycznym.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel w mojej ocenie spełnia aktualne wymagania merytoryczne i formalne określone w *art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora*. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pani mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę fakt, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ze względu na istotny wkład w rozwój badań związanych z endogennymi związkami tiolowymi, wartość poznawczą pracy, ogromną staranność w dokumentacji uzyskanych wyników, których znaczna część została już opublikowana w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym oraz posiada znamiona możliwości wdrożenia tych wyników w badaniach diagnostycznych wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel.

R. Gądoła - Kopicuch