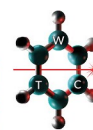




Wojskowa
Akademia
Techniczna

Wydział
Nowych Technologii i Chemii



Warszawa, dn. 30.03.2023 r.

dr hab. Krzysztof Kuśmierek, prof. WAT
Instytut Chemii, Wydział Nowych Technologii i Chemii
Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego
ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgra Krystiana Purgata

pt.: „*Wykorzystanie mikroekstrakcji w elektroforetycznej analizie moczu na zawartość tiolaktonu homocysteiny*” wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pana dr hab. Pawła Kubalczyka, prof. UŁ

Homocysteina, obok cysteiny i glutationu, jest uważana za jeden z trzech najważniejszych aminokwasów tiolowych występujących w organizmie człowieka. Jest jednak aminokwasem dość specyficznym, bowiem mimo iż jest homologiem cysteiny i równocześnie pochodną metioniny, od której różni się brakiem grupy metylowej przy atomie siarki, nie uczestniczy w budowie białek. Ten niezwykle istotny aminotiol nie jest dostarczany do organizmu wraz z pokarmem, powstaje w ustroju wyłącznie w wyniku przemian metabolicznych metioniny, a jego podwyższone stężenie w organizmie jest niezależnym czynnikiem ryzyka przedwczesnego rozwoju chorób cywilizacyjnych. Ponadto, pod wpływem działania nieswoistego enzymu syntetazy metionilo-t-RNA, homocysteina może ulegać cyklizacji do tiolaktonu homocysteiny (HTL), który ze względu na dużą łatwość w przechodzeniu przez błony komórkowe do osocza krwi i równocześnie dużą reaktywność, może łączyć się z resztami lizyny znajdującymi się w łańcuchach białek. Efektem takiej

reakcji, zwanej N-homocysteinylacją, jest zmodyfikowanie białek, zmiana ich struktury przestrzennej, jak również właściwości biologicznych. Tiolaktonu homocysteiny, zwany często „reaktywną pochodną homocysteiny”, jest wiązany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób naczyniowo-sercowych i neurodegeneracyjnych u ludzi. Ważne jest zatem posiadanie odpowiednich narzędzi analitycznych pozwalających na monitorowanie poziomu HTL w płynach ustrojowych. Najczęściej analizowanym płynem ustrojowym jest osocze, które charakteryzuje się stałym, niezmiennym składem, natomiast mocz, z niezrozumiałych powodów, jest niedoceniany. Analiza moczu jest co prawda zadaniem znacznie trudniejszym niż osocza, głównie ze względu na większe skomplikowanie matrycy, jednak z drugiej strony wydaje się być, przede wszystkim ze względu na łatwy i nieinwazyjny sposób pobierania próbek, analizą bardzo perspektywiczną. Dlatego też problem badawczy podjęty przez Pana mgra Krystiana Purgata, czyli opracowanie nowych procedur analitycznych oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka techniką elektroforezy kapilarnej, jest bardzo ważny i aktualny.

Praca została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana. Cała rozprawa liczy 190 stron, 13 tabel i 83 rysunków, i ma typowy układ dla tego typu dysertacji, na który składa się: wstęp, część literaturowa, część eksperymentalna, podsumowanie i wnioski końcowe oraz piśmiennictwo. Wykaz skrótów i symboli zamieszczony na początku pracy oraz spisy treści, tabel i rysunków umożliwiają jej szybkie przeglądanie i powrót do najbardziej interesujących fragmentów. Szkoda tylko, że przy pisaniu tego pierwszego Doktorant był trochę niekonsekwentny i pominął kilka istotnych, pojawiających się dość często w pracy skrótów np. RSD, FIA, FLD, GC. Część literaturowa składa się z czterech rozdziałów i została napisana w oparciu o najnowszą literaturę (cała bibliografia liczy aż 243 pozycje). Poszczególne rozdziały dotyczą odpowiednio biochemii homocysteiny i tiolaktonu homocysteiny, przeglądu opisanych w literaturze metod oznaczania HTL, podstaw teoretycznych i praktycznych wykorzystanej w pracy techniki badawczej – elektroforezy kapilarnej oraz technik przygotowania próbek do analizy na drodze ekstrakcji ze szczególnym uwzględnieniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (SDME). Podoba mi się zamieszczona w rozdziale drugim tabela (Tabela 1), która podsumowuje i porównuje opisane w literaturze metody oznaczania HTL porządkując tym samym aktualny stan wiedzy na ten temat.

Część eksperymentalna pracy zawiera wyniki badań własnych Doktoranta, których celem było opracowanie elektroforetycznych procedur oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka. W sumie w pracy przedstawiono trzy kompletne procedury analityczne:

- oznaczania HTL za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej „*on-line*” – w układzie pomiarowym CE;
- oznaczania HTL za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej „*off-line*” – poza układem pomiarowym CE;
- oznaczania HTL za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej „*off-line*” – poza układem pomiarowym CE oraz spiętrzania analitu na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego.

Opracowanie każdej z tych metod wymagało optymalizacji jej poszczególnych etapów m.in. warunków separacji elektroforetycznej; procedury wykonania mikroekstrakcji zarówno bezpośrednio w układzie elektroforetycznym jak i poza układem w trybie „*off-line*”; czy też procedury zatężania analitu na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FASI). Wyniki zostały przedstawione w przejrzysty sposób w postaci licznych rysunków. Trochę dla mnie niezrozumiałe jest jednak przedstawianie wpływu optymalizowanych parametrów zarówno na wysokość jak i na pole powierzchni piku/sygnалу analitu (rozdziały 3.1, 5.1 i 5.2). W przypadku oznaczeń chromatograficznych, a zwłaszcza elektroforetycznych, do opisu rejestrowanego sygnału analitycznego rekomenduje się raczej pole powierzchni piku a nie jego wysokość.

Po optymalizacji, każda z opracowanych procedur została zwalidowana, skalibrowana i zastosowana do oznaczania stężenia HTL w moczu pozornie zdrowych ochotników. Bardzo dobrym pomysłem Doktoranta było porównanie opracowanej metody, w formie tabeli, z innymi opisanymi w literaturze metodami oznaczania HTL (tabele 5, 9 i 12). Trochę jednak szkoda, że w kolejnych tabelach Autor niejako „zapominał” o swoich wcześniejszych osiągnięciach i nie zamieszczał dla celów porównawczych poprzednich procedur. Moim zdaniem aż się prosi aby w ostatniej tabeli (tabeli 12) zamieścić wyniki nie tylko dla metody SDME-FASI-CZE, ale również dwóch wcześniejszych – SDME-CZE (*off-line*) i SDME-CZE (*on-line*). Trochę niejasna jest też dla mnie przedstawiona na stronie 92 procedura pomiaru pH próbek moczu zmieszanych z buforem fosforanowym. Pomiar pH próbki, której całkowita objętość wynosi 600 μ l (200 μ l moczu + 400 μ l buforu) za pomocą pehametru wydaje się technicznie niemożliwy.

Całościowo, część eksperymentalną należy jednak ocenić wysoko; poszczególne etapy pracy zaplanowane i zrealizowane przez Doktoranta wymagały bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego i świadczą o jego dużej dojrzałości naukowej.

Praca kończy się podsumowaniem i wnioskami końcowymi będącymi niejako ukoronowaniem całej, dobrze napisanej, dysertacji. Cała praca jest napisana poprawnym językiem i jest przygotowana bardzo starannie pod względem redakcyjnym. Niestety, Doktorant nie uniknął drobnych potknięć językowych używając niewłaściwej nomenklatury i sformułowań np.:

- „*wprowadzanie próbki na kolumnę*” (str. 33) lub „*nałożenie próbki na kolumnę*” (str. 34) – powinno być „*dozowanie lub wprowadzanie do kolumny*”;
- „*supernatant*” (str. 92) – powinno być „*roztwór nad osadem*”;
- „*doszczepianie próbki*” (m.in. str. 40, 102, 103, 108, 146) – powinno być „*wzbogacanie próbki*”;
- „*prędkość przepływu*” fazy ruchomej w odniesieniu do chromatografii gazowej (str. 23). O ile jest to jak najbardziej prawidłowe sformułowanie w przypadku chromatografii ciekłej i elektroforezy kapilarnej gdzie mamy do czynienia z „*ciekłą*” fazą ruchomą, to w przypadku fazy ruchomej w stanie gazowym bardziej prawidłowy jest termin „*natężenie przepływu strumienia gazu*”.

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają pracy i nie mają istotnego wpływu na jej merytoryczną ocenę.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgra Krystiana Purgata dotyczy aktualnych i istotnych z praktycznego punktu widzenia zagadnień. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje wiele elementów nowości naukowej. Przedstawiona w pracy metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, a sposób prezentacji wyników jest jasny i czytelny, zaś ich interpretacja pokazuje, że Doktorant potrafi logicznie i kompetentnie analizować uzyskane wyniki. W moim przekonaniu opiniowana rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów i w związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Chemiczne z wnioskiem o jej przyjęcie i dopuszczenie Pana mgra Krystiana Purgata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Kisielecki