



Politechnika Łódzka
Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej
tel. (42) 631 31 17 fax: 42 631 31 28
ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź



Dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska, prof. PŁ

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **MONIKI WYSZCZELSKIEJ-ROKIEL** zatytułowanej
**„Chromatograficzne badania tiazolidynowych i tiazynowych
pochodnych endogennych aldehydów”**

wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi
Promotorem pracy doktorskiej jest
dr hab. Rafał Głowacki, prof. UŁ

Wstęp

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest aktualna i dotyczy związków zawierających siarkę, które są przedmiotem zainteresowania ośrodków naukowych w Polsce i na świecie, zajmujących się zwłaszcza badaniami biomedycznymi. Biologicznie ważne związki siarki, takie jak aminokwasy siarkowe są od wielu lat przedmiotem badań naukowych w zespole, którym obecnie kieruje pan prof. Rafał Głowacki. Prezentowana rozprawa jest przykładem właściwego rozszerzenia tematyki realizowanej na Wydziale Chemicznym UŁ przez pana prof. Edwarda Balda. Homocysteina i cysteina są endogennymi aminokwasami tiolowymi, których obniżone, bądź podwyższone stężenie występujące w płynach ustrojowych ludzi może mieć istotny związek z występowaniem różnych stanów chorobowych. W literaturze naukowej sporo uwagi poświęca się poszukiwaniom rozwiązań, które ułatwiłyby kontrolowanie poziomu stężeń homocysteiny i cysteiny w materiałach biologicznych. Ponadto, niezwykle ważne jest zrozumienie procesów biochemicznych, które zachodzą z udziałem tych niskocząsteczkowych tioli.

Zaprezentowane w pracy wyniki, które pragnę wyraźnie podkreślić poprzedzone zostały szeregiem przemyślanych, trudnych i znużających eksperymentów, pozwoliły na wykazanie możliwości powstawania tiazynowych i tiazolidynowych pochodnych w

warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Substratami tych reakcji były właśnie endogenne aminokwasy tiolowe- cysteina i homocysteina oraz N-homocysteinylowa albumina a także aldehyd mrówkowy, octowy i fosforan 5'-pirydoksalu.

Należy w tym miejscu podkreślić, że tematyka rozprawy doktorskiej jest ważna zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznego wykorzystania opracowanych metod chromatograficznych w badaniach próbek biologicznych.

Struktura i treść rozprawy doktorskiej

Recenzowana praca mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel liczy 131 stron, składa się z części literaturowej(41 stron) oraz z części doświadczalnej, która obejmuje szczegółowo opisane procedury analityczne, uzyskane wyniki badań z rozbiem na zagadnienia dotyczące opracowanych metod chromatograficznych, badań reaktywności endogennych aminokwasów tiolowych względem wybranych aldehydów oraz wyniki związane z próbami derywatyzacji tiazynowych i tiazolidynowych aminokwasów tiolowych a także szczegółową dyskusję uzyskanych wyników badań oraz przedstawienie trafnych końcowych wniosków. W rozprawie zawarte są także: krótki wstęp, informacje dotyczące wykorzystania soli chinoliniowych do derywatyzacji związków siarki, analityka endogennych aminokwasów oraz powiązanie ich z różnymi chorobami, w tym chorobami neurodegeneracyjnymi, do których wlicza się chorobę Parkinsona i Alzheimera. Ponadto, w pracy przedstawiono jasno sprecyzowany cel i zakres prowadzonych zadań badawczych. Cytowana literatura obejmuje 176 pozycji naukowych polskich i zagranicznych, z przewagą tych drugich.

Wykaz dorobku naukowego Doktorantki jest bardzo dobry i wskazuje na dużą jej aktywność naukową (4 opublikowane prace naukowe, w tym 3 w dobrych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej), liczne wystąpienia konferencyjne obejmujące zarówno komunikaty ustne jak i posterowe oraz udział w projektach naukowych jako współwykonawca (jeden z projektów finansowany przez Narodowe Centrum Nauki).

W części literaturowej Autorka omówiła zagadnienia dotyczące derywatyzacji chemicznej, która w przypadku związków tiolowych jest niezbędnym etapem przygotowania próbki, ponieważ zabezpiecza reaktywną grupę tiolową przed reakcjami utleniania. Szczegółowo opisała wykorzystanie soli chinoliniowych do derywatyzacji endo- i egzogennych związków zawierających siarkę. Doktorantka, przedstawiła także dane dotyczące stosowania soli chinoliniowych (tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego i jego pochodnej tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidynowego) w analizie próbek biologicznych. Jasno wskazała znaczenie endogennych aminokwasów

tiolowych, ze szczególnym uwzględnieniem tych o dużym znaczeniu biologicznym, czyli cysteiny i homocysteiny. Szczególnie godne podkreślenia jest to, że w pracy przedstawiono trudności jakie można spotkać podczas oznaczania aminokwasów tiolowych w próbkach biologicznych, gdzie często zawartość analitu jest kilka a czasami kilkaset razy niższa od stężeń pozostałych składników matrycy. Tę część pracy oceniam wysoko. Przedstawione w niej dane są dobrym wprowadzeniem do dalszych zagadnień omawianych w kolejnych rozdziałach dysertacji.

Cel badań został sformułowany czytelnie i poprawnie. Dotyczył zbadania możliwości reakcji homocysteiny (Hey) i cysteiny (Cys) z fosforanem 5'-pirydoksalu (PLP), aldehydami mrówkowym i octowym w warunkach fizjologicznych oraz opracowania metod, które pozwalają na oznaczanie powstających w wyniku tych reakcji tiazynowych i tiazolidynowych pochodnych w roztworach wodnych standardów oraz osoczu człowieka.

Cel główny pracy obejmował zadania badawcze, takie jak: opracowanie metody równoczesnego oznaczania endogennych tioli nisko- i wielkocząsteczkowych w próbkach wodnych standardów i osoczu, zbadanie reaktywności endogennych aminokwasów tiolowych wobec aldehydu mrówkowego, octowego i fosforanu 5'-pirydoksalu w warunkach fizjologicznych *in vitro*, zbadanie reaktywności cysteiny i homocysteiny względem fosforanu 5'-pirydoksalu *in vivo*. Ponadto, syntezę 7-acetyloamino-4-merkaptu-2,1,3-benzoksadiazolu (AABD-SH) - odczynnika derywatyzującego anality poprzez grupę karboksylową i umożliwiającego oznaczanie badanych tiazynowych i tiazolidynowych pochodnych z wykorzystaniem detektora spektrofluorymetrycznego oraz opracowanie metody oznaczania Cys-PLP techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis. W tym miejscu chcę podkreślić, że realizacja założonego celu głównego i zadań badawczych wymagała ogromnego eksperymentalnego wkładu pracy Doktorantki.

W części doświadczalnej rozprawy szczegółowo omówiono między innymi: opracowanie metod chromatograficznego oznaczania albuminy i tioli niskocząsteczkowych w roztworach wodnych standardów i osoczu z uwzględnieniem zależności wydajności poszczególnych reakcji derywatyzacji, optymalizację warunków redukcji wiązań disiarczkowych, doboru warunków chromatograficznego rozdzielania tioli niskocząsteczkowych i albuminy, walidację opracowanych metod i ich zastosowanie do próbek rzeczywistych. Opracowanie materiału doświadczalnego wskazuje na bardzo dobre opanowanie umiejętności eksperymentalnych przez Doktorantkę, o czym świadczy chociażby świadomość potrzeby zmodyfikowania procedury syntezy 7-acetyloamino-4-merkaptu-2,1,3-benzoksadiazolu (AABD-SH), prowadzącej do istotnego zwiększenia wydajności procesu.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Dokonując oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej i dyskusji wyników za najbardziej wartościowe w przedstawionej pracy uznaję opracowanie i opublikowanie nowej chromatograficznej metody równoczesnego oznaczania różnych form tioli niskocząsteczkowych i albuminy, w jednym postępowaniu analitycznym.

Ponadto, ważnym elementem rozprawy w moim odczuciu było:

- wykazanie, że reakcja powstawania tiazynowych i tiazolidynowych pochodnych aminokwasów tiolowych i aldehydów może zachodzić także w warunkach *in vivo*,
- wykazanie, że fosforan 5'-pirydoksalu (PLP) może występować w organizmie także w postaci związanej - w formie tiazolidynowej pochodnej cysteiny,
- zmodyfikowanie procedury otrzymywania 7-acetyloamino-4-merkaptobenzoksadiazolu (AABD-SH).

Uwagi

Z obowiązku recenzenta, który poza podkreśleniem niewątpliwych zalet tej pracy ma także obowiązek wskazania pewnych uwag i postawienia pytań, niniejszym to czynię. Wcześniej jeszcze chcę wyraźnie podkreślić, że praca mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel jest bardzo starannie przygotowana, dotyczy to także strony graficznej. Zauważone usterki redakcyjne, błędy stylistyczne i interpunkcyjne w pracy są nieliczne i nie obniżają wartości naukowej przedstawionej rozprawy doktorskiej.

Wśród niedociągnięć w pracy należy wymienić m.in. błędne zapisy w nazwach raz pisane *in vivo* bez myślnika innym razem właśnie z myślnikiem (str.8, 43,100 i 121), błędy literowe występujące w wyrazie: „probek” (str. 46), kropka po liczbie 8 (str. 53, ostatnia linijka), niefortunne zapisy z ciągłym nadużywaniem wyrazu derywatyżacja, który można starać się zastąpić chociażby zwrotem przeprowadzenie w pochodne (m.in. str.57 ostatnie 3 linijki od dołu,) „...kinetykę reakcji derywatyżacji, wydajność w zależności od nadmiaru odczynnika derywatyżującego....:), „...wydajność reakcji derywatyżacji w zależności od nadmiaru molowego zastosowanego odczynnika derywatyżującego.” (str.58 ostatni akapit). Nadużywanie i nieprawidłowe stosowanie wyrazu i wyrażenia detekcja, właściwości detekcyjnych, detekcja mas (przykładowo str.13-15, niezrozumiałe przedostatnie zdanie w 2 akapicie str.15 „Reakcje derywatyżacji są także stosowane podczas analiz

chromatograficznych wykorzystujących detekcję mas. W tym przypadku mają one najczęściej na celu zwiększenie stopnia jonizacji analitu”).

Pośród uwag dyskusyjnych i merytorycznych można wymienić:

- Wykaz skrótów na początku rozprawy jest niekompletny, brak wyjaśnienia m.in. skrótów HILIC, IPR, RP, R_s i inne.
- Utrudniają czytanie pracy stosowane przecinki, zamiast średników, np. „...o stężeniu 0,2 mol/l i następującym pH: 6, 7,4, 8, 9 i 10” i „...wprowadzono po 50 ml osocza, 0,25, 0,5, 1,1,5, 2 i 2,5 ml (Hcy)₂...” (np. str.51, 53).
- Niefortunne zdanie „...pochodne chinoliny wyizolować można wykorzystując pirolizę bądź inne reakcje rozkładu” (str.16, 2 akapit). Piroliza nie jest techniką izolacji związków.
- Zdanie „...glutationu, ma właściwości detoksykujące miedź, ołów i kadm” (str.25, ostania linijka 1 akapitu). A co np. z rtęcią?
- Brak informacji w punkcie dotyczącym odczynników zsyntezowanych w laboratorium (str. 44) o odczynniku derywatyzującym AABD-SH, dopiero na dalszych stronach pracy (str. 78-79) pojawia się szczegółowy opis.
- Brak podpisu pod rysunkami na str. 74 i 83 (opisy pojawiają się dopiero na następnych stronach).
- Brak odnośników literaturowych do wzoru na str. 86, dotyczącym rozdzielczości (R_s).
- Brak komentarza do rysunku na str. 94.

Podsumowanie recenzji

Z całym przekonaniem stwierdzam, że Doktorantka wykazała się wiedzą w tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Należy zwłaszcza podkreślić ogrom pracy doświadczalnej przez Nią wykonany związany z opracowaniem i walidacją metod chromatograficznych oraz umiejętnością interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników.

Oceniając pracę doktorską mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel stwierdzam, że praca dotyczy aktualnej i ważnej tematyki, zarówno pod względem poznawczym, jak i praktycznym oraz wnosi elementy nowości w zakresie opracowania nowej metody chromatograficznej oznaczania różnych form tioli niskocząsteczkowych i albuminy, w jednym toku analitycznym. Dlatego uzyskane w tej rozprawie doktorskiej wyniki badań czynią ją wyjątkowo interesującą, o dużej wartości poznawczej a opracowane metody mogą zostać wykorzystane także w praktyce diagnostycznej.

Praca spełnia warunki określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 20003 r., nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami).

Wniosek końcowy

Podsumowując, wyrażam przekonanie, że recenzowana rozprawa mgr Moniki Wyszczelskiej-Rokiel zatytułowana „**Chromatograficzne badania tiazolidynowych i tiazynowych pochodnych endogennych aldehydów**” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy i wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Helena-Czaplińska

Łódź, 6 listopada 2015 roku