

Toruń, dnia 5 września 2021 r.

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej zatytułowanej
„Badanie liponylolizyny i kwasu liponowego w kontekście ich właściwości antyoksydacyjnych”
wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Ocena wyboru tematyki badawczej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska była realizowana w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pani dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ, w zespole, który od wielu lat zajmuje się poszukiwaniem nowych rozwiązań w zakresie przygotowania próbek biologicznych do analizy, ze szczególnym zwróceniem uwagi na homogenizację, derywatyzację, redukcję, ekstrakcję i deproteinizację. Opracowanie nowych procedur analitycznych jest obecnie bardzo pożądane zwłaszcza w przypadku rutynowych analiz, gdzie dąży się do zminimalizowania etapów izolowania wybranych analitów, czy skrócenia czasu analizy prowadzące nie tylko do obniżenia zużycia często toksycznych rozpuszczalników (ukłon w stronę zielonej chemii), ale również jednostkowego kosztu analizy. Jest to tematyka aktualna i niosąca nowatorskie rozwiązania, co skłoniło Panią mgr Adrianę Warkoczewską do podjęcia badań, których celem było opracowanie czułych, selektywnych i nieskomplikowanych procedur analitycznych umożliwiających monitorowanie całkowitej zawartości liponylolizyny (LLys) i kwasu liponowego (LA) w próbkach biologicznych (osocze, mocz i tkanka). Z dużą dozą staranności Doktorantka wybrała do badań te dwa związki, ponieważ mają one ogromne znaczenie dla zdrowia człowieka biorąc po uwagę głównie choroby cywilizacyjne a zwłaszcza neurodegeneracyjne. Dlatego też, wybór tematyki badawczej prezentowany w recenzowanej rozprawie doktorskiej jest aktualny i ważny z naukowego punktu widzenia.

Ocena merytoryczna rozprawy

Dysertacja przygotowana została w formie komentarza (46 stron) do spójnego tematycznie cyklu pięciu współautorskich prac, które opublikowane zostały w latach 2016-2020. Trzy artykuły ukazały się w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, zaś dwie w czasopiśmie o obiegu krajowym. Sumaryczna punktacja publikacji stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej to *Impact Factor* równy 11,325, co odpowiada 291 punktom MNiSW. Dokumentację uzupełniają

kopie wszystkich prac wchodzących w wyżej wspomniany cykl oraz oświadczenia współautorów, które wymagane są w przypadku rozpraw doktorskich przygotowanych w takiej formie. Z zamieszczonych oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Adrianna Warkoczevska wniosła istotny wkład w powstanie koncepcji przedstawionych badań, realizację poszczególnych zadań badawczych, opracowanie wyników oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptów publikacji. Komentarz do cyklu publikacji zwieńczony jest opisem sylwetki naukowej Doktorantki. Część ta przygotowana została starannie i wyczerpująco.

W publikacjach, które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej przedstawiono przegląd literaturowy oraz wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę. Artykuły te przeszły już rygorystyczny proces wydawniczy, w którym zaangażowano przynajmniej dwóch zewnętrznych recenzentów. Stąd też ocena tych osiągnięć jest znacznie ułatwiona i powinna ograniczyć się przede wszystkim z mojej strony do merytorycznej oceny autoreferatu, który jest autorskim opracowaniem przygotowanym przez Panią mgr Adriannę Warkoczewską.

Opis osiągnięć naukowych został poprzedzony obszernym wprowadzeniem, gdzie Doktorantka przedstawiła znaczenie wybranych do badań związków na tle chorób cywilizacyjnych i aktualnego stanu wiedzy na ten temat. Dzięki tym studiom literaturowym była możliwość odkrycia istotnych braków odnośnie prostych metod przygotowania próbek mających na celu wyizolowanie liponylizyny i kwasu liponowego ze złożonych matryc biologicznych, jakimi są płyny ustrojowe oraz homogeny tkanek zwierzęcych. Za cenne należy uznać dwie prace przeglądowe poświęcone powyżej wspominatej problematyce badawczej a dotyczące homogenizacji tkanek stałych i półpłynnych (**D3**) oraz derywatyzacji chemicznej (**D5**). Szkoda, że te dwa artykuły ukazały się tylko w krajowych czasopismach (*Analityka: Nauka i Praktyka*, *Wiadomości Chemiczne*).

Cel rozprawy doktorskiej został zdefiniowany w przejrzysty sposób, a poszczególne zadania badawcze racjonalnie zaplanowane do jego osiągnięcia. Wyniki prac eksperymentalnych (**D1**, **D2**, **D4**) oraz ich omówienie Doktorantka opisała w jednym, dość obszernym rozdziale zatytułowanym „Osiągnięte wyniki i znaczenie pracy”.

Pani mgr Adrianna Warkoczevska rozpoczęła swoją pracę badawczą od opracowania metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie całkowitej zawartości LA i kwasu liponowego związanego z białkami (ProtS-LA) (**D1**). Doktorantka, aby osiągnąć ten cel wykorzystwała podczas przygotowania próbek dobrze znany odczynnik redukujący (tris(2-karboksyetylo)fosfinę - TCEP) w celu zredukowania wiązań disiarczkowych podczas oznaczania całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu. Bardzo ważnym etapem stała się optymalizacja warunków konwersji chemicznej analitów w pochodne, którą Pani mgr Adrianna Warkoczevska przeprowadziła poprzez dobór pH środowiska reakcji, ilości zastosowanego odczynnika derywatyzującego oraz czasu prowadzenia

reakcji. W wyniku tych badań Doktorantka zaproponowała bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy do konwersji chemicznej grup tiolowych w środowisku alkalicznym (bufor TRIS, pH = 9) przy zachowaniu łagodnych warunków reakcji (temperatura pokojowa) i jej krótkiego czasu (15 minut). Bardzo trafnym spostrzeżeniem podczas przygotowania próbek biologicznych okazało się wprowadzenie dodatkowego etapu odbiałczania próbek – deproteinizacji. Do końcowego oznaczania całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu Doktorantka zaproponowała wysokosprawną chromatografię cieczową, gdzie również przeprowadziła optymalizację warunków chromatograficznych pozwalających na efektywne rozdzielenie analitów od składników matrycy. Niewątpliwym osiągnięciem tej części badań było opracowanie nowej procedury analitycznej do oznaczania całkowitej zawartości LA i ProtS-LA w osoczu, która charakteryzuje się niskimi granicami wykrywalności i oznaczalności analitów oraz wysoką precyzją i czułością. Spełnione więc zostały kryteria stawiane oznaczeniom ilościowym, co zdaniem Autorki umożliwia wykorzystanie tych procedur w rutynowych analizach, badaniach farmakokinetycznych a także kontroli kwasu liponowego w suplementach.

W dalszej części pracy eksperymentalnej Pani mgr Adrianna Warkoczevska podjęła się opracowania metodyki izolowania i oznaczania LA i LLys w moczu (**D2**). W tym przypadku również niezbędna była optymalizacja między innymi: parametrów ekstrakcji, warunków derywatyzacji oraz końcowego oznaczania wybranych analitów. Autorka dobrała odpowiednie warunki, które zapewniły ilościowe przeprowadzenie LA i LLys w stabilne 2-S-pirydyniowe pochodne, przy jednoczesnym skróceniu czasu i uproszczeniu procedury przygotowania próbki. Szkoda, że nie zostały wyjaśnione wysokie wartości odzysku (powyżej 100%) otrzymane podczas badania trwałości dla wybranych związków. Podkreślić należy, że Doktorantka pomimo nieobecności białek w moczu pochodzącego od zdrowego człowieka, profilaktycznie wprowadziła zaproponowany powyżej etap odbiałczania próbek poprzez dodatek kwasu chlorowego(VII) przed wprowadzeniem próbek do układu chromatograficznego. Za ogromne osiągnięcie tej części badań można uznać zbadanie selektywności układu rozdzielającego w stosunku do wspomnianych analitów w obecności cysteiny, homocysteiny, glutationu, N-acetylo-L-cysteiny oraz cysteinyloglicyny. Doktorantka wykazała się benedyktyńską cierpliwością podczas doboru odpowiednich warunków chromatograficznych, które umożliwiły rozdzielenie pików pochodzących od wymienionych substancji i badanych związków (LA i LLys). Można więc stwierdzić, że opracowana procedura pozwala na oznaczenie zawartości tych dwóch analitów w próbkach moczu ludzkiego z odpowiednią selektywnością na niskim poziomie stężeń.

Zwieńczeniem pracy eksperymentalnej było opracowanie kolejnej procedury analitycznej umożliwiającej oznaczenie całkowitej zawartości LA i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych. Doktorantka zaproponowała proste metody przygotowania próbek wątroby, serca, nerek i żołądka pochodzących od cieląt, świń, kurczaków oraz indyków. Podobnie jak w powyższych opracowaniach właściwego postępowania analitycznego,

można stwierdzić, że Autorka uzyskała w efekcie końcowym metodę, która nie wymaga zastosowania drastycznych warunków hydrolizy w celu wyizolowania LA z próbek. To bardzo ważny etap w przygotowaniu próbek, ponieważ może skutkować częściową degradacją LLys i niskim odzyskiem. Ponadto, zaproponowana reakcja derywatyzacji zachodzi w temperaturze pokojowej, a czas trwania analizy jest krótki, co w konsekwencji pozwala na zmniejszenie zużycia rozpuszczalników i generuje niewielkie ilości odpadów.

Podsumowując część eksperymentalną przeprowadzoną przez Panią mgr Adriannę Warkoczewską pragnę zaznaczyć, że została ona zaplanowana logicznie, a kolejność podejmowanych zadań, świadczy o metodycznym podejściu do poszczególnych zagadnień. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie przez Doktorantkę nowoczesnych narzędzi analitycznych (np. LC-MS). Podczas omawiania wyników badań Doktorantka podjęła próbę ich wyjaśnienia i interpretacji na tle aktualnych doniesień literaturowych. Uzyskane wyniki mają niewątpliwie wysoki potencjał aplikacyjny, gdyż zrealizowane badania były wielokierunkowe. Można więc jednoznacznie stwierdzić, że przedłożona do oceny dysertacja doktorska dostarcza wielu nowych informacji dotyczących oznaczania wybranych do badań związków.

Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki uważam:

- opracowanie metodyk izolowania i oznaczania liponylizyny (LLys) i kwasu liponowego (LA) w wybranych próbkach biologicznych (osocze, mocz i tkanki zwierzęce), która charakteryzuje się niską granicą oznaczalności i wykrywalności,
- potencjalna aplikacyjność precyzyjnych i czułych procedur analitycznych do prowadzenia rutynowych analiz (diagnostyka medyczna), badania farmakokinetycznych oraz kontroli suplementów,
- zaproponowanie niskoodpadowych metod przygotowania próbek ograniczających zastosowanie toksycznych rozpuszczalników (założenia zgodne z koncepcją zielonej chemii).

Z obowiązku recenzenta zmuszona jestem do zwrócenia uwagi Pani mgr Adriannie Warkoczewskiej na kilka drobnych niedociągnięć dotyczących strony redakcyjnej i językowej tekstu dysertacji. Doktorantka, moim zdaniem, posługuje się dość nietypowymi sformułowaniami np.: „*niskim odzyskiem i precyzją*” (str. 14), „*upłynnienie próbki*” (str. 15), „*próbka moczu doszczepionego*” (str. 28, 29), „*detektor UV-Vis-DAD*” (str. 32), itp. Zasadniczo jednak strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń, dotyczy to zarówno sporządzania przypisów i zestawionej bibliografii. Można więc stwierdzić, że Doktorantka opanowała tym samym podstawy warsztatu pisarstwa naukowego.

Pani mgr Adrianna Warkoczevska jest młodym naukowcem, o wyróżniającym dorobku naukowym, na który składa się łącznie 7 prac oryginalnych (z bazy *Journal Citation Reports*) opublikowanych w latach 2019-2020 o sumarycznym IF = 26,678 oraz dwóch artykułów, które ukazały się w krajowych czasopismach (*Analityka: Nauka i Praktyka*, *Wiadomości Chemiczne*). Rozpoznawalność prac współautorstwa Pani

mgr Adrianny Warkoczewskiej znajduje swoje odzwierciedlenie w liczbie cytowań (36) oraz wysokim, jak na tak młodego naukowca wskaźniku Hirscha (3). Doktorantka w swoim dorobku naukowym posiada również prezentację prac w formie wystąpień ustnych (6 komunikatów) oraz posterów naukowych (łącznie 18) przedstawionych na zjazdach krajowych i zagranicznych.

Podkreślić należy wybiegającą daleko poza standardowe ramy aktywność Doktorantki na wczesnym etapie działalności naukowej. Pani mgr Adrianna Warkoczevska jest laureatką konkursu PRELUDIUM Narodowego Centrum Naukowego (kierownik projektu) oraz wykonawcą zadań badawczych w ramach projektu dla młodych naukowców (Uniwersytet Łódzki). Za najlepszą, oryginalną publikację otrzymała zespołową nagrodę Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej stanowi oryginalne opracowanie naukowe, a uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę z zakresu chemii analitycznej, a w szczególności przygotowana próbek. Ponadto, opracowane procedury analityczne mogą być wykorzystane w medycynie do identyfikacji wybranych analitów w próbkach biologicznych. Doktoranta wykazała się zdolnością prowadzenia wnikliwych studiów literaturowych, umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania otrzymanych wyników badań, krytycznej oceny faktów oraz formułowania wniosków.

Rozprawa doktorska Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej zatytułowana *Badanie liponyloliżyny i kwasu liponowego w kontekście ich właściwości antyoksydacyjnych*, przygotowana pod opieką dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie chemii analitycznej jako dyscypliny naukowej, co potwierdza nabycie przez Nią umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam tym samym, że rozprawa Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej spełnia ustawowe warunki stawiane pracom doktorskim (*art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami*) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność tematyki badawczej, wysoki poziom poprowadzonych badań i walory aplikacyjne wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Warkoczewskiej.

Renata Gąsior-Kopciuch