



Prof. Joanna Karpińska
Wydział Chemii
Uniwersytet w Białymstoku

Białystok, 19 lipca 2021

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Warkoczewskiej pt. :”Badanie liponylizyny i kwasu liponowego w kontekście ich właściwości antyoksydacyjnych”

Wstęp

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ. Jest to zbiór pięciu publikacji poprzedzony szczegółowym komentarzem zawierającym uzasadnienie podjętego tematu oraz zadań wykonywanych przez doktorantkę w celu realizacji założonego celu naukowego.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Warkoczewskiej skupia się na opracowaniu nowych procedur oznaczania kwasu liponowego (LA) i liponylizyny (LLys) w próbkach biologicznych takich jak mocz, krew oraz tkanki zwierzęce. Wybór obiektu badań nie jest przypadkowy, gdyż jest kontynuacją realizowanych od szeregu lat w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego badań dotyczących nowych procedur oznaczania związków tiolowych w próbkach środowiskowych. Kwas liponowy jest ośmiowęglowym kwasem tłuszczowym zawierający pięcioczłonowy heterocykliczny pierścień ditiolowy. Wzrost zainteresowania kwasem liponowym jest obserwowany w ostatnich latach ze względu na coraz wyższą świadomość znaczenia procesów prowadzących do powstania w organizmie tzw. stresu oksydacyjnego, chorób wywoływanych tym stanem oraz poszukiwaniach sposobów ich zapobiegania. Dużą rolę w prewencji chorób wywołanych narażeniem na stres oksydacyjny przypisuje się naturalnym związkom o właściwościach redukujących, tzw. antyutleniaczom. Kwas liponowy będący istotnym elementem mitochondrialnego łańcucha oddechowego wydaje się spełniać wszystkie wymagania stawiane tego typu związkom. Suplementacja preparatami kwasu liponowego jest stosowana w terapiach np. cukrzycy, chorób wą-

troby, zatruciach metalami ciężkimi i grzybami i szeregu innych. Stąd istnieje potrzeba zarówno kontroli jakości pojawiających się coraz liczniej suplementów zawierających LA, jak również kontrola kinetyki wchłaniania i wydalania LA z organizmów pacjentów. Do realizacji tego celu potrzebne są nieskomplikowane procedury pozwalające na szybkie i precyzyjne oznaczanie badanego analitu. W swojej rozprawie mgr Warkoczewska skupiła się na opracowaniu procedur oznaczania kwasu lipoнового oraz jego połączenia z egzogennym aminokwasem białkowym lizyną w osoczu krwi, moczu oraz w homogenatach tkanek zwierzęcych. Jako technikę oznaczania zaproponowała wysoko-sprawną chromatografię cieczową z detektorem z matrycą diodową (DAD). Takie rozwiązanie aparaturowe daje szansę na włączenie opracowanych procedur do katalogu rutynowych oznaczeń diagnostycznych. Chromatografy cieczowe z detektorami DAD są w tej chwili relatywnie tanie i łatwe w obsłudze, w przeciwieństwie do detektorów MS.

Struktura i treść rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Warkoczewskiej jest zwartym zbiorem pięciu artykułów, w tym trzech artykułów eksperymentalnych i dwóch przeglądowych. Układ prezentowanej rozprawy jest typowy. Na rozprawę składa się 47 stronicowy komentarz Doktorantki, ankieta dorobku (7 stron) oraz oświadczenia współautorów. Komentarz został podzielony na trzy części: Wprowadzenie, Osiągnięte wyniki i znaczenie pracy, Podsumowanie oraz Bibliografia. Artykuły eksperymentalne zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o łącznym IF = 11,325 (291 punktów MEiN), zaś przeglądowe zostały opublikowane w krajowych prestiżowych czasopismach branżowych *Analityce* i w *Wiadomościach Chemicznych*. W pracach D2, D4 i D5 Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś w pracy D5 autorem korespondencyjnym. Załączone oświadczenia współautorów wskazują, że udział Doktorantki w przygotowaniu prezentowanego cyklu artykułów był jasno określony i kluczowy. Ponadto, w przedstawionym do recenzji materiale, znalazły się naukowe osiągnięcia Doktorantki: pozostałe publikacje (cztery publikacje sumaryczny IF= 15,353, punkty MEiN=370) oraz wykaz wystąpień konferencyjnych prezentowanych w formie komunikatów i posterów. W latach 2016-21 mgr Warkoczewska z powodzeniem aplikowała o fundusze na badania. Uzyskała w roku 2016 finansowanie z dotacji celowej Uniwersytetu Łódzkiego dla młodych naukowców oraz w roku 2017 grant Preludium finansowany przez NCN (realizacja 2017-21). Dorobek publikacyjny, wystąpienia konferencyjne (konferencje krajowe i zagraniczne), kierowanie grantem bez wątplenia wskazują na wysokie zaangażowanie Doktorantki w działalność naukową. Artykuły będące podstawą cy-

klu doktorskiego były opublikowane w dobrych i w bardzo dobrych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania: Arabian Journal of Chemistry, Bioanalysis, Journal of Agricultural and Food Chemistry oraz w Analityce i Wiadomościach Chemicznych.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W części pierwszej komentarza Doktorantka zamieszcza uzasadnienie podjętego tematu pracy oraz jasno formułuje cele badań. Część druga podzielona jest na szczegółowe podrozdziały, które odzwierciedlają postępy prac nad opracowaniem opisanych procedur oznaczania LA i LLys; „Przygotowanie próbek do analizy”, „Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego”, „Walidacja opracowanych metod analitycznych” oraz „Aplikacja opracowanych procedur”. W każdym z podrozdziałów zamieszczona jest szczegółowa dyskusja dokonywanych wyborów warunków chemicznych takich jak rodzaj rozpuszczalnika, pH medium reakcyjnego, czas reakcji, wirowania itp. Takie podejście włącza czytelnika w proces opracowania zaplanowanej procedury analitycznej, pozwala na śledzenie postępów prac wraz z jednoczesną analizą materiału zawartego w artykułach.

Pierwszym etapem było opracowanie procedury przygotowania próbek. Zawartość LA i LLys była badana w moczu i osoczu pozyskanych od wolontariuszy oraz w homogenatach tkanek zwierzęcych. W układach rzeczywistych LA występuje w trzech formach: jako wolny kwas liponowy, luźno związany z białkami słabymi wiązaniami wodorowymi (protS-LA) oraz związany kowalencyjnie poprzez aminokwas lizynę z cząsteczkami białek tworząc ugrupowanie liponylolizynowe. Izolację LA prowadzono stosując klasyczną ekstrakcję ciecz-ciecz acetonitrylem. Jako czynnik odbiałczający wykorzystano kwas chlorowy(VII). Oznaczenie całkowitej zawartości LA w próbce biologicznej wymagało włączenia do procedury analitycznej etapu hydrolizy. Zdecydowano się na zastosowanie łagodnej hydrolizy enzymatycznej pomimo dłuższego czasu niż w przypadku drastycznej hydrolizy kwasowej lub alkalicznej. Łagodne warunki hydrolizy enzymatycznej pozwalają na uniknięcie strat analitu spowodowanych działaniem mocnych kwasów lub zasad. Dobór i optymalizacja warunków ekstrakcji są bardzo dobrze opisane. Stosując roztwory wzorcowe z dodatkiem albuminy ludzkiej została wyznaczona efektywność ekstrakcji. Zwrócono szczególną uwagę na homogenizację próbek biologicznych jako krytycznego etapu w procedurze analitycznej. Niecałkowita homogenizacja, wzrost temperatury czy możliwość zanieczyszczenia próbki materiałem ciemnym mogą być źródłem błędów wpływających na wiarygodność końcowego wyniku oznaczenia. Doświadczenia związane z tym wstępnym etapem procedury analitycznej zostały zebrane i opublikowane w języku polskim jako artykuł przeglądowym D3.

Wybór odpowiedniego odczynnika derywatyzującego jest niezwykle istotny w przypadku technik instrumentalnych. Przekształcenie analitu w odpowiednią pochodną pozwala na dostosowanie go do użytej techniki (lotność, trwałość wzmocnienie właściwości fluoro -czy chromoforowych) wprowadzenie odpowiednich Przeгляд najczęściej stosowanych odczynników derywatyzujących w technice chromatografii cieczowej został zamieszczony w pracy przeglądowej D5. Ponieważ kwas liponowy nie zawiera w swojej strukturze ugrupowań chromoforowych, należało przekształcić go w pochodną kompatybilną z wykorzystywanym detektorem. Jako odczynnik derywatyzujący wybrany został bromek 1-benzylo-2-pirydyniowy (PCPB). Przyłączenie grup znacznikowych do cząsteczki LA wymagało optymalizacji warunków otwarcia pierścienia ditiolowego (redukcji) oraz warunków reakcji zredukowanej formy LA z PCPB. Została wyznaczona stechiometria powstającej pochodnej pirydyniowej oraz jej trwałość. Reakcja LA z odczynnikiem derywatyzującym zachodziła szybko i ilościowo poprzez ugrupowania tiolowe. Ponieważ pasma adsorpcji PCPB i nowopowstałej pochodnej są odległe od siebie, nadmiar użytego odczynnika nie przeszkadza w oznaczeniu LA i LLys.

Jako technikę oznaczania Doktorantka wybrała chromatografię cieczową z detektorem DAD. Opracowała metodę oznaczania LA w osoczu krwi (D1), LA i liponylizyny (LLys) w moczu ochotników po suplementacji kwasem liponowym (D2) oraz metodę oznaczania La i LLys w homogenatach tkanek zwierzęcych (D4). We wszystkich pracach dobrała warunki rozdzielania chromatograficznego, stosowane eluenty, programy elucji izokratycznej i gradientowej. Wszystkie opracowane procedury zwalidowane. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i cenne z punktu widzenia farmakokinetyki LA oraz oceny zawartości całkowitego LA i jego frakcji białkowej. W pracy D4 po raz pierwszy zbadano potencjał antyoksydacyjny LA w postaci liponylizyny metodą rodnika DPPH.

Podsumowując analizę rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Warkoczewskiej, stwierdzam że założone we wstępie cele badawcze zostały zrealizowane. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki mogę zaliczyć:

1. Opracowanie procedur przygotowania próbek biologicznych pozwalających na oznaczenie całkowitej zawartości LA i jego frakcji wolnej, luźno związanej oraz w postaci liponylizyny;
2. Opracowanie czułych metod oznaczania LA;
3. Opracowanie procedury hydrolizy enzymatycznej;
4. Synteza liponylizyny i zaproponowanie ścieżki fragmentacji w warunkach detekcji spektrometrią mas;
5. Ocena potencjału antyoksydacyjnego LA i LLys metodą DPPH.

Uwagi i pytania

Recenzent poza oczywistym podkreśleniem walorów i zalet rozprawy doktorskiej ma także obowiązek wskazania błędów i postawienia pytań do dyskusji. Praca mgr Adrianny Warkoczewskiej jest przygotowana bardzo starannie, tabele, rysunki, schematy i znajdujące się opisy są czytelne i na ogół napisane poprawnym polskim językiem chemicznym. Jednak użycie słowa „doszczepiony” na określenie próbek „wzbogaconych” wzorcem lub „z dodatkiem wzorca” jest w moim odczuciu niepoprawne (str. 26, 28, 29).

We wstępnej części komentarza Doktorantka skupiła się głównie na uzasadnieniu podjętego tematu, bardzo szeroko opisując zagadnienia związane ze znaczeniem odpowiedniej diety, aktywnością biologiczną kwasu liponowego, jego wykorzystaniem w medycynie. Zabrakło niestety głębszego opisu właściwości chemicznych LA, szczególnie jego właściwości oksydacyjno-redukcyjnych. Informacja ta pozwoliłaby na interpretację wyników wygaszania rodnika DPPH przez formy utlenioną i zredukowaną LA i LLys (D4). Prosiłabym o wyjaśnienie uzyskanych wyników w kontekście potencjałów redoks LA i DPPH. Zabrakło mi również przedstawienia reakcji syntezy BCPB. Chociaż ten wątek nie wiąże się bezpośrednio z tematem dysertacji, jego zamieszczenie zapewne wzbogaciłoby rozprawę. Również przedstawienie głębszych badań spektralnych produktów derywatywacji (widma IR, NMR) byłoby dodatkowym argumentem potwierdzającym powstawanie produktu, jak również potwierdzałoby postulowaną strukturę. Czy była konieczna normalizacja wyników oznaczenia LA i LLys na karnitynę (praca D2)? Uzyskane wyniki badań próbek moczu dają informację o steżeniu analitów a tym samym jest zniwelowana zmienność spowodowana różną objętością pozyskanego od wolontariuszy moczu. Prezentacja w postaci znormalizowanej nie pozwala na porównanie otrzymanych wyników z zakresem liniowości opracowanej metody.

Wniosek końcowy

Na podstawie lektury rozprawy mgr Adrianny Warkoczewskiej mogę stwierdzić, że Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą na temat problemów związanych z analityką kwasu liponowego. Jej rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim (art. 13 ust. z dn. 14 marca 2003 Dz. Ustaw nr 65, poz. 595). Wnoszę więc o dopuszczenie mgr Adrianny Warkoczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Dodatkowo, biorąc pod uwagę wysoki poziom zrealizowanych badań udokumentowany publikacjami w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania, wnoszę do Rady Dyscypliny Chemia Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy.

Joanna Karpińska