



UNIWERSYTET  
O P O L S K I

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole  
tel. 077 452 71 00  
fax 077 452 71 01  
chemia@uni.opole.pl  
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek  
e-mail: [Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl](mailto:Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl)

Opole, 2022-02-28

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Pani mgr Moniki WIECZOREK**

zatytułowanej

### **„Zastosowanie chromatografii gazowej w analizie moczu i śliny na zawartość tiolaktonu homocysteiny”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Moniki Wieczorek została wykonana w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała Głowackiego jako promotora. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są zagadnienia związane z opracowaniem nowych efektywnych metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny (HTL) w moczu i ślinie człowieka z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS).

Choroby układu krążenia i nowotworowe to jedne z najważniejszych przyczyn zgonów i dotyczą ludzi na całym świecie. Co istotne stale rośnie liczba nowych przypadków tych chorób. Jest to powodem rosnącego zainteresowania sprawą poszukiwania skutecznych, niskocząsteczkowych markerów tych chorób, w celu ich diagnozowania. Bowiem wykrycie tych chorób we wczesnym stadium rozwojowym daje większą szansę skutecznego ich wyleczenia. Do interesujących związków o aktywności biologicznej oraz potencjalnej toksyczności należą endogenne aminokwasy tiolowe, których niskie lub zbyt wysokie stężenie w ustroju człowieka jest oznaką procesu chorobowego. Jednym z najważniejszych tego typu związków jest tiolakton kwasu 2-amino-4-merkaptomasłowego (tiolakton homocysteiny), metabolit pośredni w szlaku przemian metioniny (Met) w organizmie. Jest to chemicznie reaktywny związek, który reaguje z resztami lizynowymi białek dając ich N-homocysteinowe pochodne, które powodują powstawanie wielu stanów patologicznych w

organizmie człowieka. Powszechnie funkcjonuje zatem w literaturze hipoteza dotycząca zależności pomiędzy podwyższonym stężeniem HLT a rozwojem wymienionych wyżej chorób. Dlatego też niezbędne są efektywne metody oznaczania HLT w płynach fizjologicznych w celu monitorowania jego stężenia. Oznaczanie substancji w skomplikowanych matrycach, jakimi są płyny ustrojowe człowieka, z wysoką precyzją i dokładnością stanowi stałe wyzwanie dla chemików analityków. Jest to bowiem istotny element badań klinicznych związanych zarówno z diagnostyką, jak z mechanizmem działania tych związków. Problem jest istotny, ponieważ do tej pory opracowano tylko kilka procedur analitycznych dotyczących oznaczania HLT w próbkach biologicznych wykorzystujących wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) i elektroforezę kapilarną (CE), przy czym dotyczyły one próbek moczu i osocza. Nie ma natomiast metod analitycznych dotyczących oznaczania tych związków w ślinie, interesującym materiale biologicznym, możliwym do pobrania w prosty, nieinwazyjny sposób.

Zespół badawczy Katedry Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego od wielu lat zajmuje się badaniami związanymi z opracowywaniem procedur oznaczania niskocząsteczkowych związków siarki niezbędnych w wyjaśnieniu mechanizmów ich działania w organizmie człowieka. Badania koncentrują się również na opracowywaniu metod oznaczania aminokwasów zawierających atom siarki oraz ich pochodnych.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Wieczorek, wykonana pod kierunkiem Prof. Rafała Głowackiego, mieści się w tym zakresie i dotyczy opracowania oryginalnych, prostych i czułych metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu i ślinie człowieka z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Oceniana rozprawa została napisana w układzie mieszanym, klasycznym ale zgodnie z przepisami zawartymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2, część doświadczalna i uzyskane wyniki przedstawione są w spójnym tematycznie zbiorze 3 prac oryginalnych opublikowanych w prestiżowych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF), poprzedzonych krótkim omówieniem/streszczeniem i jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie z listy ministerialnej. Wszystkie prace, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, to prace wieloautorskie. W materiałach zamieszczono oświadczenia określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów publikacji. Z oświadczeń tych wynika, że w pracach tych udział Doktorantki w ich realizacji był znaczący, zarówno w realizacji, jak i w opracowaniu manuskryptów

publikacji, o czym świadczy również fakt, że w dwóch z nich mgr Monika Wieczorek jest pierwszym, a w dwóch pozostałych drugim autorem.

Praca składa się z sześciu rozdziałów poprzedzonych wykazem skrótów i symboli, wykazem publikacji wchodzących w skład rozprawy oraz wstępu. Dostarczone dokumenty, zawierają ponadto streszczenie w języku angielskim, wykaz cytowanej literatury, dorobek naukowy Doktorantki, w którym wymienione są, udział w realizacji projektów badawczych, rodzaj prowadzonych zajęć dydaktycznych oraz inne osiągnięcia. Na uwagę zasługuje fakt, iż przedstawiona w dokumentacji lista prac naukowych zawiera również 3 publikacje z listy filadelfijskiej i dwa rozdziały w monografiach, które nie wchodzą w zakres rozprawy, jednaście wystąpień ustnych i 10 plakatów na konferencjach oraz udział jako wykonawca w dwóch projektach finansowanych przez NCN.

Zasadniczym celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie oryginalnych, prostych i czułych metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu i ślinie człowieka z wykorzystaniem chromatografii gazowej ze spektrometrem mas jako detektorem oraz oszacowanie potencjału analizy śliny w diagnostyce chorób cywilizacyjnych.

Pierwsze dwa rozdziały pracy to w zasadzie omówienie literatury przedmiotu. W pierwszym z nich Autorka opisuje właściwości fizykochemiczne, występowanie i powstawanie w organizmie oraz rolę tiolaktonu homocysteiny i jej związek z różnymi typami chorób. Natomiast w rozdziale drugim przedstawia metody oznaczania HTL w płynach fizjologicznych rozpoczynając od opisu moczu, osocza i śliny jako użytecznych materiałów diagnostycznych. Zwróciła przy tym uwagę na problemy związane ze standaryzacją etapu pobrania i przygotowania próbki do analizy. Wykazała, że w przypadku śliny, materiału pobieranego w prosty i nieinwazyjny sposób, problemem jest standaryzacja materiału ze względu na wpływ wielu czynników osobniczych na jej skład i wydzielaną ilość. Następnie omawia metody stosowane do oznaczania HTL w materiale biologicznym, czyli najczęściej stosowane wysokosprawną chromatografię cieczową i elektroforezę kapilarną. Podkreśla, że wymagająca derywatywacji analitu, chromatografia gazowa była do tego celu stosowana tylko raz i dotyczyła analizy tej cząsteczki w osoczu krwi. Następnie podaje w dosyć szczegółowe uzasadnienie podjęcia badań, wskazując że niewiele jest metod oznaczania HTL w płynach fizjologicznych, przy czym nie ma metod oznaczania jego obecności w ślinie i brak jest jakichkolwiek badań dotyczących potencjału chromatografii gazowej w oznaczaniu HTL w



HTL w ślinie. To moim zdaniem w pełni uzasadnia podjęcie badań dotyczących opracowania procedury oznaczania tego analitu w ślinie z wykorzystaniem chromatografii gazowej.

Kolejny rozdział, zatytułowany „Wyniki” zawiera kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy, każda poprzedzona krótkim omówieniem. Realizację założonego programu badań mgr Monika Wiczorek rozpoczęła od opracowania procedury oznaczania HTL w moczu z wykorzystaniem GC-MS (praca D1). Opracowanie metody rozpoczęła od doboru odczynnika derywatyizującego, umożliwiającego uzyskanie lotnej pochodnej, wykorzystując do tego celu chloromrówczan izobutyli. Następnie zoptymalizowała procedurę ekstrakcji analitu z próbek moczu, po czym dobrała warunki rozdzielania chromatograficznego. Wreszcie opracowaną procedurę poddała walidacji, wyznaczając zakres liniowości, dokładność, precyzję oraz granice wykrywalności i oznaczalności i wykazała jej przydatność do analizy próbek rzeczywistych. Po wykazaniu przydatności metody GC-MS do oznaczania HTL w moczu, zajęła się opracowaniem procedury oznaczania tego związku w próbkach śliny, w celu stwierdzenia jego obecności w tej matrycy (praca D2). Przed opracowaniem metody analitycznej dobrała warunki usunięcia interferentów i ekstrakcji analitu z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz. Natomiast do przekształcenia HTL w lotną pochodną wykorzystowała reakcję silylacji stosując mieszaninę N-trimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamidu i chlorku trimetylosililowego (MSTFA/TMCS) i dobrała optymalne warunki przeprowadzenia reakcji. Następnie przeprowadziła walidację metody, która wykorzystana w analizie próbek moczu i śliny pobrane od kilkunastu osób. Określiła korelację między zawartością analitu w moczu i ślinie, co pozwoliło na wykazanie użyteczności śliny jako materiału diagnostycznego. W dalszym etapie pracy mgr Monika Wiczorek podjęła próbę opracowania procedury analitycznej, wykorzystującej do oznaczania GC-MS, umożliwiającej jednoczesne oznaczanie w próbkach śliny zarówno tiolaktonu homocysteiny, jak i innych ważnych biologicznie związków siarki, metabolitów metioniny (praca D3). Przeprowadziła walidację opracowanej procedury i wykazała jej przydatność w analizie tych substancji w próbkach rzeczywistych. Natomiast w publikacji D4 opisała procedury analityczne wykorzystujące chromatografię gazową w analizie moczu i śliny do oznaczania tiolaktonu homocysteiny. W tej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Analityka* omawia zalety i wady poszczególnych etapów tej procedury analitycznej oraz możliwości wykorzystania w diagnostyce oraz jej ograniczenia. Praca ta moim zdaniem stanowi dobre podsumowanie osiągniętych efektów w porównaniu do danych literaturowych. Po przedstawieniu wyników

następuje kilkustronicowe podsumowanie efektów przeprowadzonych badań z uwzględnieniem zalet i ograniczeń opracowanych procedur analitycznych i możliwości wykorzystania śliny w diagnostyce medycznej, jako zamiennika moczu i osocza oraz wnioski końcowe.

Do najciekawszych wyników uzyskanych przez Doktorantkę zaliczam:

- wykazanie, że chromatografii gazowa sprzężona ze spektrometrią mas jest użyteczną metodą analityczną do oznaczania HTL zarówno w próbkach śliny, jak i moczu i może być alternatywą dla HPLC i CE powszechnie stosowanych metod analizy tej substancji;
- wykazanie, że dostępne komercyjne odczynniki derywatyzujące, czyli chloromrówczan izobutyli i N-trimetylosililo-N-metylotrifluoroacetamid, mogą być wykorzystane w procedurze przeprowadzenia analitu w lotną pochodną;
- wykazanie, że HTL jest obecny w ślinie człowieka, a jego stężenie jest zbliżone do stężenia w próbkach moczu
- wykazanie użyteczności śliny, materiału biologicznym, możliwym do pobrania w prosty, nieinwazyjny sposób jako materiału diagnostycznego;
- opracowanie efektywnych metod przygotowania próbek rzeczywistych do analizy z wykorzystaniem metod ekstrakcyjnych.

Na uwagę zasługuje fakt, iż rozprawa jest napisana bardzo dobrze i ładną polszczyzną, oczywiście pomijając będące częścią rozprawy publikacje w języku angielskim, co sprawia że czyta się ją z przyjemnością. Treści zawarte w poszczególnych częściach rozprawy podane są we właściwych proporcjach i są zgodne z zakresem podjętych badań. Zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim praca nie budzi zastrzeżeń. Drobne błędy redakcyjne dostrzeżone przez recenzenta, a jest ich tak mało, że nie warto ich nawet wymieniać, nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony publikacji przedstawionych w rozprawie doktorskiej. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokiej renomie.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016, poz. 882). Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Monika Wieczorek wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań dotyczących opracowania skutecznych metod analitycznych użytecznych w analizie płynów fizjologicznych. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Moniki Wieczorek **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'P. Wierzord', is positioned in the lower right quadrant of the page.