



Zakład Bioanalityki
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 09

prof. dr hab. Emilia Fornal
Zakład Bioanalityki
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b
20-090 Lublin
tel. 81 448 65 09
e-mail: emilia.fornal@umlub.pl

Lublin, 9 czerwca 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Frankiewicz
pt. „Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych
w wybranych matrycach biologicznych za pomocą techniki HPLC/DAD”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Wiktorii Frankiewicz pod promotorstwem dr. hab. Roberta Zakrzewskiego została złożona do oceny w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

W rozprawie Doktorantka podjął się opracowania dwóch czułych i selektywnych metod analitycznych do oznaczaniu jonów siarczkowych w próbkach biologicznych - ludzkim moczu i kurzej wątrobie.

Siarkowodór i siarczki są związkami, które pełnią ważne funkcje w organizmie. Siarkowodór, podobnie jak tlenek azotu jest ważnym mediatorem, m.in. uczestniczy w regulacji ciśnienia krwi, procesów zapalnych i oksydacyjnych, ma neuroprotektoryjne działanie. Siarczki metali odgrywają kluczową rolę w wielu enzymach i białkach niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek, w tym enzymach odpowiedzialnych za oddychanie komórkowe. Jednocześnie nadmierna ekspozycja na siarkowodór i siarczki jest szkodliwa dla zdrowia i może prowadzić do zgonów. Precyzyjny i dokładny pomiar stężenia siarkowodoru oraz siarczków jest kluczowy dla lepszego zrozumienia przebiegu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, do terapeutycznego monitorowania leków uwalniających siarkowodór, jak również do badań nad nowymi lekami. Z tego też względu włączenie się Doktorantki w badania zmierzające do ustalenia, czy nowe odczynniki derywatywacyjne pozwolą na opracowanie nowych

procedur analitycznych, które zapewnią czułe, powtarzalne, szybkie i łatwe ilościowe oznaczanie jonów siarczkowych w próbkach biologicznych uważam za cenne. Doktorantka umiejętnie zidentyfikowała ważny obszar badawczy, dobrze zdefiniował problem badawczy i prawidłowo wyznaczyła cel badań.

Rozprawa doktorska mgr Wiktorii Frankiewicz licząca 129 strony ma klasyczną strukturę. Pracę otwiera spis treści, który prezentuje strukturę poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów rozprawy doktorskiej. Doktorantka wyodrębniła trzy rozdziały: Wprowadzenie, Część Teoretyczną i Część Doświadczalną, po których zamieściła streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Pracę zamyka bibliografia zawierająca 138 odnośniki literaturowe. W rozdziałach Doktorantka wyodrębniła podrozdziały, trafnie uporządkowała prezentowane zagadnienia. Wstęp i cel pracy zawarła w rozdziale Wprowadzeniu. Omówieniu zagadnień teoretycznych Doktorantka poświęciła 24 strony. Wyniki własnych badań (rozdz. 3.6) wraz ze stosowanymi metodami (rozdz. 3.1-3.5) oraz podsumowaniem i wnioskami (rozdz. 3.7) przedstawiła na 88 stronach. Struktura rozprawy jest poprawna. Doktorantka wykazała się umiejętnością prawidłowego porządkowania, prezentowania i omawiania prowadzonych badań naukowych.

W pierwszym rozdziale Części Teoretycznej swojej pracy mgr Frankiewicz krótko przedstawiła właściwości, zastosowania i reaktywność soli piryliowych, wskazując na ich liczne zastosowania w różnych obszarach w tym w biotechnologii, farmacji, chemii, analityce medycznej i przemyśle. Następnie przeszła do omówienia właściwości i zastosowania jonów siarczkowych. Przedstawiła właściwości chemiczne i biologiczną aktywność. Omówiła procesy biochemiczne, w których uczestniczy siarkowodor i siarczki. Przedstawiła zarówno ich działania toksyczne, jak i funkcje, jakie pełni w organizmie, regulując procesy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek i tkanek. W trzecim, ostatnim, rozdziale Części Teoretycznej Doktorantka przedstawiła metody wykorzystywane do oznaczania siarczków i kwasu siarkowodorowego. Kolejno omówiła metody normatywne, spektrofotometryczne oparte na derywatywacji prowadzącej do powstania barwnych produktów lub produktów wykożujacych fluoresncncję, metody elektrochemiczne w tym potencjometryczne, amperometryczne i polarograficzne. Zaprezentowała ich wady i zalety. Następnie swoją uwagę skupiła na metodach chromatograficznych. Wskazała, że do ilościowego oznaczania siarkowodoru i siarczków wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczerwą, chromatografię gazową i chromatografię cienkowarstwową. Przedstawiła przykłady zastosowań

oznaczeń chromatograficznych w analizach siarczków w różnych matrycach biologicznych w tym w osoczu, pełnej krwi, erytrocytach, mózgu, wątrobie, sercu, kale. Podkreśliła, że do oznaczeń wykorzystywana jest również elektroforeza kapilarna. Doktorantka trafnie zauważyła, że wiele z tych metod jest wieloetapowych, wymaga stosowania dużej ilości materiału i dużego nakładu pracy, co powoduje, że mają one mały potencjał do wdrożenia do rutynowych oznaczeń.

Część Teoretyczną Doktorantka przygotowała w oparciu o obszerne badania literaturowe. Autorka dysertacji cytuje w tej części rozprawy 126 pozycje literaturowe, które przedstawiają aktualny stan wiedzy na temat poruszanych zagadnień. Doktorantka prawidłowo dobrała źródła i dokonała ich przeglądu w sposób syntetyczny i klarowny. Swobodnie porusza się w tematyce dotyczącej zastosowań i właściwości siarkowodoru i siarczków oraz metod analitycznych wykorzystywanych do ich oznaczania, zna ich zalety oraz ograniczenia. W mojej ocenie Doktorantka posiadała wiedzę teoretyczną niezbędną do prawidłowej realizacji podjętych badań naukowych.

Główny cel badań wraz z uzasadnieniem podjęcia badań mgr Frankiewicz przedstawiła na początku pracy doktorskiej w rozdziale Wprowadzenie. Cel został sformułowany w sposób ogólny. Doktorantka nie wyodrębniła celów szczegółowych. Cel główny został precyzyjnie zdefiniowany. Szkoda, że Doktorantka nie zdecydowała się na sformułowanie i przedstawienie celów szczegółowych, które wskazałyby, w jaki sposób Doktorantka zamierza osiągnąć cel główny ani na zaprezentowanie zaplanowanych zadań badawczych.

Część doświadczalną Doktorantka rozpoczęła od przedstawienia procedur analitycznych stosowanych podczas badań. Wymieniła niezbędną do realizacji prac aparaturę i urządzenia laboratoryjne oraz odczynniki chemiczne. Opisała przygotowanie roztworów potrzebnych do przeprowadzenia eksperymentów. Przedstawiła procedury syntezy odczynników derywatyzyjnych oraz analityczne. Następnie przeszła do omówienia przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników.

W pierwszym etapie podjętych badań mgr Frankiewicz przeprowadziła optymalizację metody chromatograficznej. Dokonała doboru długości fali do monitorowania produktów reakcji derywatyzyjacji oraz odczynników derywatyzyjnych (371 i 580 nm dla produktów oraz 356 i 540 nm dla odczynników, odpowiednio w przypadku zastosowania wodorosiarczanu(VI) 2,4,6-trifenylopirylu oraz chloranu(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu).

Ustaliła, że optymalne rozdzielanie uzyskuje się w układzie RP-HPLC stosując kolumnę z sorbentem C18 i izokratyczny skład fazy ruchomej (woda - acetonitryl - bufor fosforanowy). Szczegółowe warunki analizy Doktorantka przedstawiła w tabeli nr 5. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że całkowity czas analizy nie przekracza 10 min (9 min dla pochodnej powstałej w wyniku derywatywacji siarczków wodorosiarczanem(VI) 2,4,6-trifenylopirylu, L3; 6 min dla pochodnej powstałej w wyniku derywatywacji siarczków chloranem(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu, LN3) gwarantując dużą przepustowość oznaczeń laboratoriom, które wdrożą opracowaną metodę. Warunki analizy chromatograficznej przedstawiła w tabeli nr 5.

W kolejnym etapie prac badawczych mgr Frankiewicz podjęła się optymalizacji warunków reakcji derywatywacji jonów siarczkowych za pomocą soli piryliowych - wodorosiarczanu(VI) 2,4,6-trifenylopirylu (L1) oraz chloranu(VII) 4-[*p*-(*N,N*-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu (LN1). Zbadała wpływ pH, rodzaju buforu (TRIS i fosforanowego), procentowej zawartości buforu TRIS i acetonitrylu w mieszaninie reakcyjnej a także rodzaju kwasu (solny, chlorowy(VII), trichlorooctowy), w celu zapewnienia właściwego odczynu reakcji derywatywacji. Po ustaleniu warunków dla reakcji derywatywacji, w powyższym zakresie, swoją uwagę skupiła na ocenie wpływu nadmiaru odczynnika derywatywacyjnego oraz czasu trwania reakcji derywatywacji. Etap optymalizacji zakończył się pomyślnie. Doktorantka warunki procesu derywatywacji dla obu metod przedstawiła w tabeli 6. Następnie mgr Frankiewicz przeszła do oceny trwałości pochodnych L3 i LN3. Ocenę prowadziła dla czterech temperatur -80°C, -20°C, 4°C (przez 3 dni) i 25°C (przez 24 godz.). Stwierdziła, że pochodne są trwałe. Będzie zapewniało odpowiednią powtarzalność metod.

W kolejnym etapie prac Doktorantka podjęła się oceny selektywności opracowanych metod derywatywacji. Reaktywność odczynników derywatywacyjnych L1 i LN3 zbadała względem szeregu jonów nieorganicznych - chlorkowych, jodkowych, azotanowych(V), fosforanowych(V), węglanowych(IV), siarczanowych(VI). Wykazała, że w opracowanych przez nią warunkach reakcji związki L1 i LN1 nie reagują z tymi jonami. Opracowane metody zapewnią selektywne oznaczanie jonów siarczkowych.

Opracowane metody mgr Frankiewicz poddała następnie bardzo skrupulatnej walidacji. Przeprowadziła walidację metod oznaczania anionów siarczkowych przy pomocy soli 2,4,6-

trifenylopirylu dla roztworów wzorcowych oraz dwóch matryc biologicznych - moczu oraz homogenatu wątroby kurzej. W przypadku matryc biologicznych przeprowadziła dodatkową optymalizację etapu derywatywacji oraz ocenę trwałości derywatów, a także optymalizację warunków homogenizacji tkanki wątroby kurzej. Wykazała, że metody mają zadowalającą powtarzalność, dokładność, zakresy oznaczalności, limity detekcji i oznaczenia ilościowego. Co istotne Doktorantka przeprowadziła walidację kierując się wymogami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 - Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących oraz wytycznymi ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology i potwierdziła, że uzyskane wyniki spełniają wymogi obu regulacji.

W ostatnim etapie prac badawczych Doktorantka wykazała aplikacyjność opracowanych metod do analizy stężenia jonów siarczkowych w moczu ludzkim oraz tkance wątroby kurzej. Wykonała oznaczenia dla próbek moczu 20 zdrowych ochotników (13 kobiet w wieku od 23 do 67 lat, 7 mężczyzn w wieku od 25 do 70 lat) oraz 30 próbek tkanki wątroby kurzej.

Przeprowadzone badania naukowe pozwoliły mgr Frankiewicz zrealizować wszystkie założone cele. Doktorantka wykazała, że sole 2,4,6-trifenylopirylu są specyficznymi odczynnikami derywatyżującymi, które umożliwiają analizy jonów siarczkowych metodą HPLC/DAD. Ustaliła optymalne warunki prowadzenia procesu derywatywacji. Wykazała, że pochodne są trwałe. Opracowała metodę chromatograficznego rozdzielania, w warunkach izokratycznych, pochodnych od nadmiaru odczynników derywatyżujących w krótkim czasie (10 min.), co zapewni dużą przepustowość dla oznaczeń. Wykazała, że metody charakteryzują się dobrymi parametrami walidacyjnym w tym niskim limitem oznaczania ilościowego i dużym zakresem liniowości. Metodę wykorzystywała do oznaczenia stężenia siarczków w moczu oraz w tkance wątroby kurzej. Wykazała, że nie ma różnicy w wyniku oznaczenia pomiędzy analizami przeprowadzonym z zastosowaniem wodorosiarczynu(VI) oraz chloranu(VII) 2,4,6-trifenylopirylu. Opracowane metody analityczne mogą zostać wdrożone do pomiarów stężenia siarczków w próbkach biologicznych w laboratoriach toksykologicznych.

W mojej ocenie mgr Frankiewicz prawidłowo zaplanowała i przeprowadziła badania, które pozwoliły Jej zrealizować założony cel.

Doktorantka w swojej dysertacji nie ustrzegła się pewnych nieścisłości, mało precyzyjnych wyrażań, błędów stylistycznych oraz wyrażań żargonowych, które wymagają korekty zanim praca

lub jej części zostaną opublikowane. Poniżej wymienię tylko te fragmenty i miejsca w pracy, na które chciałabym zwrócić szczególnie uwagę Doktorantce.

Nie jest jasne dlaczego Doktorantka wybrała jako matryce biologiczne ludzki moczek i kurzą wątrobę do swoich badań? Jakie były przesłanki dla tego wyboru? (str. 8)

„Środki przeciwrakowe” (str. 11) - powinno być „środki przeciwnowotworowe”

„zapewnia trwałość solą piryliowym” (str. 11) - powinno być „zapewnia trwałość solom piryliowym”

W rozdziale 2.2 Doktorantka zawarła dużo informacji z różnych obszarów. Wskazane byłoby wyodrębnienie podrozdziałów, aby ułatwić czytelnikowi odbiór treści.

Tytuły tabel umieszcza się przed tabelą.

Tylko cyfry i liczby porządkowe pisze się z kropką. Nie stawia się kropki po cyfrach i liczbach głównych.

„w większości związkach chemicznych ją posiadających” (str. 25) - powinno być „w większości związków ją posiadających”

„Na podstawie światowej literatury techniki spektroskopowe [35, 83], chromatograficzne [84-88] oraz elektrochemiczne [89-91] są najczęściej wykorzystywane do detekcji i oznaczania stężenia anionów siarczkowych” (str. 25) - zdanie wymaga korekty stylistycznej.

„W oparciu o artykuł T. Ubuka i in. [113] można oznaczyć zawartość siarkowodoru w próbkach homogenatu mięśnia sercowego” (str. 31) - powinno być „w oparciu o procedurę przedstawioną w artykule ...”

„Na podstawie pracy naukowej (Ż. Rembisz i in.) [125] można oznaczyć zawartość jonów siarczkowych w próbkach wód źródlanych z polskich uzdrowisk Busko Zdrój i Uniejów” (str. 33) – powinno być „w oparciu o procedury przedstawione w artykule”. Czy ta procedura nie pozwala oznaczać zawartości jonów siarczkowych w wodach innych niż źródlane z polskich uzdrowisk?

„Opracowane metody analityczne posiadają charakter rutynowy” (str. 110) - Nowo opracowane metody nie są metodami rutynowymi, mogą się takimi dopiero stać, gdy zostaną wprowadzone do oznaczeń rutynowych i będą wykorzystywane rutynowo do analizy próbek w laboratorium, które te metody wdrożyło.

Czy w tabelach parametrów walidacyjnych oraz wyników oznaczeń Doktorantka prawidłowo podaje jako jednostkę nmol? Proszę o weryfikację czy wartości są raportowane jako liczba moli analitu wprowadzona na kolumnę czy jako stężenie analitu. Na przykład na stronie 95 zakresy liniowości krzywych są podawane jako 20-1500 nmol oraz 10-500 nmol, a we wnioskach na stronie 110 jako 20-1500 nmol/l i 10-500 nmol/l. Uwag niniejsza dotyczy tekstu całej pracy.

Podsumowując, Doktorantka trafnie zidentyfikowała ważny problem badawczy, klarownie go przedstawiła i poprawnie sformułowała cel badawczy. Właściwie dobrała metody badawcze i zaplanowała eksperymenty, które pozwoliły Jej opracować, zwalidować i zademonstrować użyteczność nowych metod chromatograficznych do oznaczania jonów siarczkowych, w których jako odczynniki derywatywacyjne wykorzystwała sole piryliowe - wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu oraz chloran(VII) 4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopirylu. Ponadto mgr Frankiewicz wykazała się umiejętnością analizy i interpretacji danych oraz przeprowadzenia dyskusji naukowej. Praca doktorska wymaga jednakże uważnej korekty jednostek przy parametrach walidacyjnych metod oraz wyników oznaczeń.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty i argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Wiktorii Frankiewicz pt. „Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych za pomocą techniki HPLC/DAD” przygotowana pod opieką promotorską dr. hab. Roberta Zakrzewskiego spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm. i wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do Spraw Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Chemiczne o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dn. 9 czerwca 2023