

dr hab. Krzysztof Kuśmierek, prof. nadzw. WAT
Instytut Chemii, Wydział Nowych Technologii i Chemii
Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego
ul. Gen. Witolda Urbanowicza 2, 00-908 Warszawa



Wojskowa
Akademia
Techniczna

Warszawa, dn. 15. 04. 2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Marty Krawczyk-Walach

pt.: „*Chromatografia cieczowa w oznaczaniu związków siarki w próbkach biologicznych*”

wykonanej w Katedrze Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

pod kierunkiem dr hab. Grażyny Chwatko, prof. nadzw. UŁ

Siarka jest jednym z podstawowych makroelementów niezbędnych do biosyntezy szeregu metabolitów oraz innych ważnych składników komórkowych organizmów żywych. Wchodzi w skład centrów aktywnych wielu enzymów, bierze również udział w tworzeniu struktury drugo- i trzeciorzędowej białek. Spośród wszystkich związków siarki obecnych w organizmie niewątpliwie największym zainteresowaniem cieszą się aminokwasy tiolowe. Związki te, powiązane wzajemnie w szlaku metabolicznym cysteino-metioniny, biorą udział w większości ważnych przemian biochemicznych organizmu. Ich podwyższone stężenia w tkankach i płynach ustrojowych człowieka powiązane z patogenezą wielu chorób i z tego powodu mogą stanowić swego rodzaju biomarker stanu zdrowotnego organizmu. Ostatnio zwrócono baczną uwagę na siarkowodór, który przez wiele lat był uznawany za związek toksyczny. Pojawiające się coraz liczniejsze prace naukowe pokazały, że związek ten jest bardzo istotny w funkcjonowaniu organizmu, a jego rola wcale nie jest taka niekorzystna jak się początkowo wydawało. Siarkowodór wykazuje zarówno negatywny jak i pozytywny

wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka, jednak jego rola nie została jeszcze w pełni wyjaśniona i wymaga dalszych badań. Zbadanie roli siarkowodoru oraz powiązanych z nim siarki sulfanowej i siarki kwasowo-labilnej w organizmie jest możliwe tylko przy zastosowaniu odpowiednio czułych i precyzyjnych metod analitycznych. W tę właśnie niezwykle aktualną tematykę badawczą wpisuje się recenzowana praca doktorska mgr Marty Krawczyk-Walach, wykonana pod kierunkiem Pani Profesor Grażyny Chwatko, której celem było opracowanie nowych chromatograficznych metod oznaczania siarki sulfanowej, siarki kwasowo-labilnej i tiosiarczanów w próbkach biologicznych (roślinach i moczu człowieka). Podjęcie przez Doktorantkę takiej tematyki uważam za uzasadnione. Tego typu badania są intensywnie prowadzone na świecie, a praca doktorska stanowi istotne ich rozwinięcie i uzupełnienie.

Praca liczy 174 strony, 55 rysunków, 20 tabel i 93 pozycje literaturowe. Cytowane publikacje pochodzą w większości z ostatnich dziesięciu lat, co wskazuje, że temat pracy dotyczy bardzo aktualnych zagadnień. Rozprawa podzielona jest na dwie główne części – część literaturową, poprzedzoną wykazem stosowanych skrótów i symboli oraz dwustronicowym wstępem, i część eksperymentalną. Część literaturowa została podzielona na dwa rozdziały. W pierwszym Autorka opisała metabolizm siarkowodoru i jego rolę w organizmie wprowadzając czytelnika w to trudne zagadnienie. W rozdziale drugim Doktorantka opisała obecnie stosowane metody oznaczania siarkowodoru i dokonała ich krytycznej analizy. Dotychczas opisane metody pozwalają oznaczać poziom H_2S w krwi, osoczu oraz tkankach zwierzęcych, i są do siebie dość podobne – w zdecydowanej większości opierają się na reakcji z monobromobimananami. Podoba mi się bardzo zamieszczona w rozdziale obszerna tabela (Tabela 1), która porządkuje aktualny stan wiedzy na ten temat i pokazuje ewolucję metod oznaczania H_2S w ostatnich latach.

Część eksperymentalna pracy doktorskiej mgr Marty Krawczyk-Walach, zawarta na stronach 53-145, podzielona jest na 5 rozdziałów. Układ części doświadczalnej jest typowy dla dysertacji w dziedzinie nauk ścisłych i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Część ta składa się z rozdziałów poświęconych kolejno: stosowanym odczynnikom, roztworom i aparaturze, stosowanym procedurom oznaczania siarkowodoru i jego form w próbkach roślinnych i moczu człowieka, oraz trzech rozdziałów, w których przedstawione są szczegółowe wyniki dotyczące opracowania procedur oznaczania form siarkowodoru w tkankach roślinnych, oznaczania tiosiarczanów w próbkach warzyw krzyżowych i wreszcie określenia korelacji

między różnymi formami siarki w moczu osób na diecie bogatej w warzywa krzyżowe. Wśród oznaczanych związków znalazły się siarka sulfanowa, siarka kwasowo-labilna, tiosiarczany, cysteina, homocysteina, cysteinyloglicyna i tiolakton homocysteiny. Całość kończy dyskusja wyników oraz wnioski końcowe.

Zastosowane w pracy, i przedstawione w rozdziale 4, procedury przygotowania próbek do analizy składały się z kilku etapów: homogenizacji, redukcji z użyciem chlorowodoru tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), derywatywacji z użyciem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinowego (CMQT), deproteinizacji i analizy chromatograficznej. Bardzo dobrym pomysłem Doktorantki było przedstawienie stosowanych procedur w postaci zamieszczonych na rysunkach 6-13 schematów, które pozwalają czytelnikowi w łatwy sposób prześledzić poszczególne etapy przygotowania próbki.

W rozdziale 5 Doktorantka zamieściła wyniki dotyczące optymalizacji procedur oznaczania form siarkowodoru – siarki sulfanowej i siarki kwasowo-labilnej, w próbkach roślinnych, w tym dobór warunków prowadzenia redukcji i derywatywacji. Autorka stosuje początkowo dwa reduktory: ditiotreitrol (DTT) i chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP), i po przeprowadzonych eksperymentach wykazuje nieprzydatność tego pierwszego do oznaczania siarki sulfanowej. W tym miejscu rodzi się pytanie dlaczego Autorka nie sprawdziła innych stosowanych powszechnie reduktorów, np. borowodoru sodu? Jest on bardzo skutecznym i szybkim w działaniu reduktorem, powszechnie stosowanym i dobrze opisanym w literaturze, m.in. w licznych publikacjach Pani Profesor Grażyny Chwatko. Zastosowany w pracy chlorowodorek tris(2-karboksyetylo)fosfiny spełniał swoją rolę, dlatego też moje pytanie o NaBH_4 należy traktować nie jako zarzut a jako zwykłą ciekawość badacza. Pytanie budzi również dobór środowiska reakcji. Skoro siarka sulfanowa jest uwalniana z H_2S w środowisku zasadowym a siarka kwasowo-labilna w kwaśnym, to czy konieczne było prowadzenie badań optymalizacyjnych w tak szerokim zakresie pH (od 2 do 12)?

Opracowane przez Doktorantkę metody, po ich wcześniejszej kalibracji i walidacji, zostały zastosowane do oznaczenia obu form siarkowodoru w warzywach i owocach. Należy tutaj podkreślić, że obie opracowane przez Doktorantkę metody oznaczania siarki sulfanowej i siarki kwasowo-labilnej w próbkach roślinnych są pierwszymi wykorzystującymi technikę HPLC z detekcją UV-Vis, co jest niezaprzeczalnie dużym osiągnięciem i po raz kolejny potwierdza aktualność tematyki podjętej przez Panią magister. Uzyskane wyniki powinny, moim zadaniem, zostać jak najszybciej opublikowane.

Rozdział 6 zawiera opis metody oznaczania tiosiarczanów w warzywach krzyżowych opartej na reakcji derywatywacji TS za pomocą CMQT a następnie oznaczeniu chromatograficznym powstałej pochodnej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że i w tym przypadku opracowana przez Doktorantkę metoda jest pierwszą chromatograficzną metodą oznaczania tiosiarczanów w warzywach krzyżowych, która wykorzystuje technikę HPLC z detekcją UV-Vis.

W rozdziale 7, stanowiącym niejako ukoronowanie całej pracy, Doktorantka podjęła się bardzo trudnej i ambitnej próby określenia korelacji pomiędzy różnymi formami siarki w moczu osób stosujących dietę bogatą w warzywa krzyżowe. Wśród oznaczanych związków znalazły się: siarka sulfanowa, siarka kwasowo-labilna, tiosiarczany, cysteina, homocysteina, cysteinyloglicyna i tiolakton homocysteiny. Stężenia tych analitów w moczu zostały wyrażone w przeliczeniu na kreatyninę (mmol analitu na mol Crn), co pozwoliło skorygować błędy związane z nadmiernym rozcieńczeniem lub zateżeniem moczu i równocześnie uniknąć jego bardzo kłopotliwej zbiórki dobowej. W eksperymencie wzięli udział ochotnicy, którzy wyrazili chęć na wprowadzenie do swojego codziennego jadłospisu co najmniej 200 g warzyw krzyżowych przez okres 3 tygodni. W tym miejscu uważam, że warto byłoby zamieścić w pracy trochę więcej informacji dotyczących stosowanej diety. Analizując zamieszczone w tabeli 6 wyniki, można by się spodziewać, że inaczej na zawartość związków siarki w moczu będzie wpływać spożywanie 200 g kalarepy o najniższej zawartości tiosiarczanów (7,64 nmol/g), a inaczej 200 g kapusty włoskiej zawierającej aż 1110 nmol/g TS. Otrzymane przez Doktorantkę rezultaty badań są bardzo interesujące i wskazują, że wzbogacenie codziennej diety o porcję warzyw krzyżowych może wpływać na wzrost poziomu tiosiarczanów, siarki sulfanowej oraz siarki kwasowo-labilnej wydalanych wraz z moczem. Stężenia tych trzech form siarki są ze sobą wzajemnie powiązane przy wysokich wartościach współczynników korelacji. Również obecność aminokwasów tiolowych w moczu (Hcy, Cys i Cys-Gly) jest ze sobą skorelowana. Autorka wyciąga wnioski, że wszystkie oznaczane związki siarki, oprócz tiolaktonu homocysteiny, są ze sobą powiązane, i że część związków zawierających ten pierwiastek jest kumulowana i usuwana z organizmu w późniejszym czasie. Wyniki te bez wątpienia stanowią cenne źródło wiedzy na temat wpływu odżywiania na metabolizm związków siarki i są dużym osiągnięciem Doktorantki.

Część eksperymentalna kończy się obszernym podsumowaniem i wnioskami końcowymi, które są naturalnym zakończeniem bardzo dobrej, kompetentnej dyskusji. Wnioski są wiarygodne i w pełni się z nimi zgadzam.

Podsumowując, generalnie cała rozprawa doktorska napisana jest bardzo dobrym i komunikatywnym językiem, strona edytorska również nie budzi żadnych zastrzeżeń. Wszystkie eksperymenty zostały starannie zaplanowane i prawidłowo przeprowadzone, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Całą pracę oceniam wysoko. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zamieścić parę uwag krytycznych. Niestety Autorka nie ustrzegła się kilku nieprawidłowych terminów, wtrętów obcojęzycznych i tzw. żargonu laboratoryjnego, np.:

- „elektrorozpylanie” – powinno być: „elektrorozpraszanie”;
- „organizm ludzki” – powinno być: „organizm człowieka”;
- „ekstrakcja nadkrytyczna” – powinno być: „ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym”;
- „supernatant” – powinno być: „roztwór nad osadem”;
- „naważki” – powinno być: „odważki”;
- „objętość próbki wprowadzonej na kolumnę” – powinno być: „wprowadzonej do kolumny”.

Nie podobają mi się również stosowane przez Autorkę w pracy sformułowania: „oznaczanie w tkankach roślinnych”, czy „oznaczanie w tkankach warzyw”. Tkanki roślinne według kryterium pochodzenia i budowy dzieli się na tkanki twórcze (merystemy) oraz tkanki stałe. Z kolei biorąc pod uwagę pełnione przez nie funkcje, wyróżnia się tkankę okrywającą, zasadniczą (miękkiszową), wzmacniającą i przewodzącą. Autorka oznaczała związki siarki w całych, jadalnych częściach warzyw (np. liściach, korzeniu, łodydze) bez „rozbijania” ich na poszczególne tkanki. Dlatego też dla mnie, jako po części biologa, te sformułowania są trochę rażące.

Jest oczywiste, że powyższe, drobne uwagi nie mają istotnego wpływu na ocenę wartości merytorycznej całej rozprawy. Stwierdzam, że praca doktorska mgr Marty Krawczyk-Walach posiada wiele elementów nowości naukowej. Przedstawiona w pracy metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, a sposób prezentacji wyników jest jasny i czytelny, zaś ich interpretacja pokazuje, że Doktorantka potrafi logicznie i kompetentnie analizować uzyskane wyniki. Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Marty Krawczyk-Walach spełnia wszelkie wymagania stawiane ustawowo rozprawom

doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Marty Krawczyk-Walach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marty Krawczyk-Walach