



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Warszawa, 20.04.19

dr hab. Magdalena Biesaga

Pracownia Chromatografii i Analityki Środowiska

mbiesaga@chem.uw.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Marty Krawczyk-Walach  
pt „**CHROMATOGRAFIA CIECZOWA W OZNACZANIU ZWIĄZKÓW SIARKI W  
PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH**”

Rozprawa doktorska mgr Marty Krawczyk Walach napisana pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Chwatko dotyczy oznaczania różnych związków siarki, a szczególnie siarkowodoru w próbkach biologicznych. Problematyka podjęta w ramach pracy doktorskiej jest istotna, gdyż w ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się w literaturze naukowej roli siarkowodoru jako neuromodulatora i wiąże się jego nieprawidłową syntezę i metabolizm z chorobami takimi jak np. choroba Alzheimera. Siarkowodór jest związkiem, który wywiera duży wpływ na funkcjonowanie organizmów żywych w tym i organizmu człowieka. Reguluje on napięcie mięśni gładkich, wpływa na regulację ciśnienia krwi, zapobiega rozwojowi miażdżycy, chroni neurony przed stresem oksydacyjnym, wspomaga gojenie się ran oraz pełni funkcję ochronną w układzie pokarmowym. Zainteresowanie naukowców tematyką siarkowodoru oraz jego wpływem na funkcjonowanie organizmu człowieka wymaga opracowywanie nowych, mniej skomplikowanych metod określania stężenia tego związku w tkankach, z zachowaniem wysokiej precyzji i dokładności wykonywanych pomiarów, a które jednocześnie będą charakteryzowały się niskimi granicami oznaczalności.

Recenzowana rozprawa została przedstawiona na 174 stronach i składa się z części literaturowej (47 stron), wyraźnie zdefiniowanego celu pracy, części eksperymentalnej zawierającej wyniki badań własnych wraz z ich interpretacją (91 stron). Końcowa część manuskryptu zawiera wnioski (5 stron) i zbiór cytowanej literatury - 93 pozycje. W rozprawie został umieszczony, na początku, wykaz niektórych stosowanych skrótów. Na końcu znajdują się streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, spis Tabel i Rysunków oraz dorobek naukowy Doktorantki. Praca zawiera 20 Tabel i 55 rysunków. Umieszczenie wykazu skrótów na początku pracy było bardzo



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



dobrym pomysłem i ułatwiało zrozumienie tekstu, jednakże szkoda, że Autorka nie umieściła obok skrótów mniej znanych związków chemicznych ich wzorów strukturalnych. O ile posługiwanie się w tekście skrótami nazw enzymów jest uzasadnione to używanie wyłącznie skrótów zamiast nazw związków chemicznych dla czytelnika jest dość męczące i sprawia wrażenie posługiwania się żargonowym językiem.

Autorka postawiła sobie za cel opracowanie nowych metod oznaczania siarkowodoru i jego pochodnych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-VIS oraz z detekcją fluorescencyjną. Opracowane metody Doktorantka zwalidowała i wykorzystała do oznaczania powyższych związków w próbkach roślinnych oraz w moczu grupy wolontariuszy. Tematyka pracy podjęta przez p. mgr Martę Krawczyk-Walach jest aktualna i otrzymane wyniki powinny mieć duże znaczenie praktyczne, zwłaszcza, że brak jest danych literaturowych oznaczania różnych form siarkowodoru w roślinach..

W pierwszym rozdziale części literaturowej rozprawy Doktorantka scharakteryzowała najważniejsze biologicznie aktywne związki siarki, omówiła biosyntezę i metabolizm siarkowodoru. Jest to niezwykle ciekawy rozdział napisany ze znajomością procesów biochemicznych. Jednakże zabrakło mi w tej części pracy choćby pobieżnego omówienia toksycznego działania egzogenego siarkowodoru, zwłaszcza, że mimo nowych prac, wciąż istnieje wiele kontrowersji co do mechanizmu działania siarkowodoru na organizm człowieka.

Rozdział drugi wstępu poświęcony jest metodom oznaczania siarkowodoru, w którym Doktorantka położyła główny nacisk na oznaczenia z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Jednak zabrakło mi w tej części omówienia choćby bardzo skrótowo innych metod takich jak chromatografia gazowa, chromatografia jonowa z detekcją amperometryczną, polarografia itp. Te metody pozwalają w wielu przypadkach obniżyć granicę oznaczalności w stosunku do HPLC.

Autorka bardzo szczegółowo omówiła metody przygotowania próbek w każdej z opisanych metod literaturowych. Jest to zrozumiałe, gdyż opracowane przez nią metody z założenia powinny być porównywane z metodami literaturowymi, jednakże podawania szybkości obrotów wirówki czy objętości użytych odczynników jest w mojej opinii zupełnie niepotrzebne. Zabrakło mi bardziej krytycznego podejścia do omawianych metod i próby porównania tych metod ze sobą. W Tabeli 1 Autorka przedstawiła różne opisane już w literaturze metody chromatograficzne wykorzystywane do oznaczania siarkowodoru i jego pochodnych, ale zabrakło informacji o granicach wykrywalności tych metod.



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Na Rysunkach 4 i 5 Doktorantka podaje zgodnie z danymi literaturowymi reakcje z błędnie napisanym niezdysojowanym kwasem bromowodorowym, który przecież w tych warunkach występuje w postaci całkowicie zdysojowanej. Takie błędy nie powinny się zdarzać w pracach opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych, a Autorka rozprawy powinna tego typu błędy śmiało skrytykować.

W części eksperymentalnej w rozdziale 3 Doktorantka podała bardzo szczegółowe informacje dotyczące przygotowania roztworów. O ile informacje o trwałości poszczególnych roztworów są bardzo istotne to opis jaka powinna być odważka aby przygotować roztwór o stężeniu 100  $\mu\text{moli/L}$  w rozprawie doktorskiej jest zupełnie zbędny.

W rozdziale 4 rozprawy Doktorantka przedstawiła bardzo szczegółowe opisy i schematy przygotowania próbek do analizy chromatograficznej. Ponieważ są to metody opracowane przez Autorkę to podanie wszystkich informacji jest bardzo istotne. Na stronie 64 pojawia się opis przygotowania do analizy warzyw krzyżowych. Szkoda, że w części literaturowej nie opisała Doktorantka dlaczego zamierza analizować warzywa krzyżowe i jakie były kryteria wyboru warzyw do analizy. Informacje co to są warzywa krzyżowe umieściła Autorka dopiero na stronie 105.

Rozdział 5 poświęcony jest wynikom badań własnych. Poprzedzony jest on krótkim wstępem, który w moim odczuciu jest powtórzeniem już wcześniej opisanych informacji z części literaturowej i z góry podsumowaniem osiągnięć Doktorantki. Na Rys 14 Autorka umieściła wzory trisiarczku dibenzylu, trisiarczku dimetylu, tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylochinoliny, tiochinolonu które według mnie warto było umieścić na początku pracy przy wykazie skrótów. Zaprezentowanie tych wzorów dopiero na str. 82, gdy skróty nazw tych związków pojawiają się znacznie wcześniej w rozprawie jest zdecydowanie spóźnione, chociaż dobrze, że wzory te w ogóle się pojawiają. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawia wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Autorka przeprowadziła optymalizację reakcji derywatywacji. Wyniki eksperymentów są podsumowane pod każdym rysunkiem. Jednak moje ogromne zadziwienie wzbudził fakt doboru pH środowiska reakcji otrzymywania tiochinolanu. Z przedstawionych przez Autorkę danych eksperymentalnych wynika, że reakcję tę powinno się prowadzić w pH 4, ale Doktorantka uznała, że skoro w literaturze we wszystkich znanych jej pracach reakcja prowadzona jest w pH 2 to i ona będzie wprowadziła reakcję w takim środowisku. Takie podejście jest dla mnie niezrozumiałe, oznacza brak zaufania do własnych wyników i w zasadzie całkowicie przekreśla sens przeprowadzonych badań, których wyniki Doktorantka przedstawiła na Rys. 28. Krytyczne podejście do własnych wyników jest cenną cechą młodego naukowca, ale przekreślanie wyników własnych badań tylko dlatego, że są inne od danych literaturowych jest niewłaściwe, zwłaszcza, że w zacytowanym przykładzie Doktorantka świadomie wybrała zdecydowanie gorsze warunki.



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



Porównując parametry krzywych kalibracji dla siarki sulfanowej przygotowanych w matrycach jakimi były roztwór tiosiarczanu sodu, ekstrakt z kalarepy oraz moczu widać bardzo duże różnice w wartościach współczynników nachylenia odpowiednich krzywych. Jednakże wartości granic wykrywalności wyznaczone na podstawie tych krzywych są najniższe dla krzywej kalibracyjnej, która ma najniższą wartość współczynnika nachylenia, co jest sprzeczne z zasadami walidacji.

Doktorantka wykorzystała opracowane metody do oznaczenia wybranych związków siarki w moczu 27 wolontariuszy spożywających warzywa krzyżowe. Jest to ogromnie ciekawy materiał badawczy. W analizie tak dużej liczby wyników zabrakło mi wykorzystania metod statystycznych do opracowania otrzymanych wyników. Doktorantka zgromadziła ogromny materiał badawczy i wykorzystanie np. analizy głównych składowych mogłoby pomóc w zrozumieniu otrzymanych wyników. Autorka podjęła co prawda próby takiej analizy, porównując stężenia różnych form siarki ale jest ona w moim odczuciu niekompletna i wiele danych nie zostało uwzględnionych.

O ile w części literaturowej Doktorantka opisała wyniki literaturowe z wszelkimi, często niepotrzebnymi detalami, o tyle wyniki badań własnych zaprezentowane zostały bardzo skrótowo głównie w Tabelach i na rysunkach. Brak dyskusji otrzymanych wyników z danymi literaturowymi, poza jednym przypadkiem opisanym powyżej, obniża ogólną wartość pracy. Szkoda bo widać, że Mgr Marta Krawczyk-Walach przeprowadziła bardzo wiele pomiarów, które pozwoliły jej na opracowanie nowych metod i zrealizowanie głównego celu rozprawy. W pracy zabrakło mi skonfrontowania własnych metod z zaprezentowanymi istniejącymi metodami literaturowymi i wyraźnego podkreślenia zalet opracowanych przez Doktorantkę metod derywatywacji.

Rolą recenzenta jest również ocena języka rozprawy. Rozprawa doktorska pani Mgr Krawczyk Walach napisana jest w większości poprawnym językiem, jednak zdarzają się pewne lapsusy językowe których należy unikać w przyszłości. np.

str 8 Skrót SRM oznacza monitorowanie wybranej reakcji fragmentacji a nie selektywne monitorowanie reakcji

str 45 „widmo masowe” zamiast widmo mas

str.46 „wysoc fluorescencyjny tioeter” zamiast tioeter wykazujący fluorescencję

Podsumowując chciałabym podkreślić, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska p. mgr Marty Krawczyk-Walach zawiera wiele nowości naukowych, czego najlepszym dowodem są dwie publikacje naukowe w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z IF. Szczególnie chciałabym podkreślić cenne wyniki dotyczące stężenia różnych form siarki, które Doktorantka uzyskała analizując wybrane warzywa. Wyniki te powinny być jak najszybciej opublikowane, zwłaszcza, że jak



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Chemii



do tej pory w literaturze naukowej brak jest takich danych. Przedstawione wcześniej krytyczne uwagi i zastrzeżenia pozwolą, mam nadzieję, unikać Autorce w przyszłości podobnych niedociągnięć.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa p.. mgr Marty Krawczyk-Walach spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytułach Naukowych i wnoszę o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.