

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Kurpet zatytułowanej
Wykorzystanie chromatografii cieczowej do oznaczania
niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz białek obecnych w osoczu
w wybranych stanach patofizjologicznych

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kurpet została opracowana w wyniku badań prowadzonych bezpośrednio pod kierunkiem naukowym dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ, pełniącej funkcję promotorki. Prace badawcze zostały zrealizowane w ramach Doktoranckiego Projektu Badawczego nt. *Badanie wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy*, finansowanego w ramach programu Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza na Uniwersytecie Łódzkim. Eksperymenty medyczne w ramach tego projektu zrealizowano we współpracy z jednostkami klinicznymi o zróżnicowanym profilu, w tym Zakładem Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi, Kliniką Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi oraz Kliniką Reumatologii z Pododdziałem Chorób Wewnętrznych Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 2 Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Ocena wyboru tematyki badawczej

Współczesna medycyna coraz wyraźniej dostrzega konieczność wczesnego identyfikowania biomarkerów, które umożliwiłyby skuteczną ocenę ryzyka chorób przewlekłych, w tym chorób sercowo-naczyniowych, będących nadal jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Aktualność tematyki podejmowanej w niniejszej rozprawie wynika z rosnącego znaczenia interdyscyplinarnego podejścia do diagnostyki chorób cywilizacyjnych. Znaczenie wczesnej diagnostyki oraz możliwości predykcji schorzeń cywilizacyjnych rośnie w obliczu starzejącego się społeczeństwa, zmian stylu życia oraz rosnącej liczby czynników ryzyka.

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na rolę przewlekłego stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego jako czynników inicjujących i podtrzymujących procesy miażdżycowe oraz inne zaburzenia układu krążenia. Z tego względu badanie markerów odzwierciedlających te procesy – takich jak homocysteina oraz białka ostrej fazy – ma duże znaczenie diagnostyczne, prognostyczne i terapeutyczne. Znaczenie pracy podkreśla

również jej wymiar praktyczny: rozwój i walidacja nowoczesnych, czułych metod analitycznych, opartych na chromatografii cieczowej, odpowiada na współczesne potrzeby diagnostyki laboratoryjnej. Umożliwia to wiarygodne oznaczanie istotnych biologicznie związków w próbkach klinicznych, co może znaleźć bezpośrednie zastosowanie zarówno w diagnostyce, jak i w monitorowaniu terapii pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi.

Tematyka pracy wpisuje się w aktualne, interdyscyplinarne obszary badań biomedycznych, łącząc zagadnienia z zakresu patofizjologii, analityki chemicznej oraz diagnostyki. Jej szczególna wartość polega na ocenie wpływu pandemii COVID-19 oraz interwencji szczepiennych na wybrane biomarkery związane z funkcjonowaniem układu sercowo-naczyniowego, co stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat odległych skutków zdrowotnych związanych z zakażeniem SARS-CoV-2. Z powyższych względów, podjęta problematyka badawcza ma nie tylko wysoką wartość poznawczą, lecz również istotne znaczenie praktyczne. Jej aktualność potwierdzają liczne doniesienia naukowe i kierunki rozwoju współczesnej medycyny laboratoryjnej.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kurpet została napisana w języku polskim i obejmuje łącznie 242 strony. Praca składa się z części literaturowej, części eksperymentalnej oraz odrębnego rozdziału poświęconego dorobkowi naukowemu Doktorantki. Rozprawę poprzedzają: spis treści, wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Pierwszy rozdział, zatytułowany *Wprowadzenie literaturowe* (łącznie 27 stron), rozpoczyna się nietypowo, bez klasycznego wstępu, a Doktorantka od razu przechodzi do charakterystyki związków tiolowych, omawiając ich właściwości fizykochemiczne, udział w procesach biochemicznych oraz znaczenie kliniczne. Następnie Pani mgr Katarzyna Kurpet opisuje wybrane białka osocza oraz glikoproteiny, koncentrując się na ich strukturze, właściwościach fizykochemicznych, funkcjach biologicznych oraz znaczeniu diagnostycznym i patofizjologicznym. Szczególną uwagę poświęciła omówieniu ich roli w przebiegu chorób przewlekłych, takich jak choroby układu sercowo-naczyniowego, autoimmunologiczne czy metaboliczne, co stanowi istotne tło dla późniejszych rozważań eksperymentalnych. Dwa kolejne rozdziały części literaturowej (obejmujące łącznie cztery strony) poświęcone zostały omówieniu zagadnień związanych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) oraz zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 i przebiegiem choroby COVID-19. W części dotyczącej RZS Doktorantka przedstawiła podstawowe informacje na temat etiopatogenezy, przebiegu klinicznego, biomarkerów oraz aktualnych strategii terapeutycznych tej choroby autoimmunologicznej. Z kolei w rozdziale dotyczącym SARS-CoV-2 Autorka omówiła mechanizm zakażenia, odpowiedź immunologiczną gospodarza oraz potencjalne powikłania, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu infekcji oraz szczepień przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy i ogólnoustrojową odpowiedź zapalną.

Nie ukrywam, że w tej części rozprawy doktorskiej zabrakło mi aktualnego i pogłębionego przeglądu literatury z zakresu analityki, w szczególności dotyczącego metod przygotowania próbek biologicznych (np. osocza, surowicy) do analizy, w tym technik ekstrakcji, oczyszczania otrzymanych ekstraktów oraz stabilizacji badanych związków. Warto byłoby również uwzględnić przegląd dostępnych metod oznaczania ilościowego analitów tiolowych i glikoproteinowych z uwzględnieniem ich czułości, selektywności oraz ograniczeń metodycznych. Tego rodzaju syntetyczne zestawienie i ocena aktualnych rozwiązań analitycznych nie tylko wzbogaciłoby część literaturową, ale także lepiej osadziłoby część eksperymentalną rozprawy w kontekście istniejącego stanu wiedzy. Podczas lektury tej rozprawy okazało się, że informacje dotyczące metod przygotowania próbek, technik oznaczania wybranych analitów oraz walidacji procedur analitycznych, zostały wplecione w części eksperymentalnej. Mimo, że informacje te zostały w części eksperymentalnej przedstawione rzetelnie i z należytą dokładnością, ich wcześniejsze – nawet skrótowe – ujęcie w części literaturowej umożliwiłoby pełniejsze osadzenie prowadzonych badań w kontekście aktualnych trendów i standardów stosowanych w nowoczesnej chemii analitycznej i bioanalityce.

Na początku części eksperymentalnej Doktorantka zamieściła obszernie uzasadnienie podjętej tematyki badawczej oraz sformułowała nadrzędny cel pracy, którym - zgodnie z treścią rozprawy - *było stworzenie zaawansowanych narzędzi analitycznych opartych na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej, służących do ilościowego oznaczenia metabolicznie spokrewnionych związków siarki oraz wybranych białek osocza w próbkach biologicznych.*

W mojej opinii sformułowanie celu wymaga doprecyzowania, ponieważ trudno uznać technikę HPLC – powszechnie znaną i stosowaną od kilkudziesięciu lat – za „zaawansowane narzędzie analityczne” samo w sobie. Zamiast tego, cel pracy powinien zostać określony bardziej precyzyjnie i realistycznie, np. jako opracowanie i/lub optymalizacja nowych procedur analitycznych mających na celu oznaczenie wybranych analitów z wykorzystaniem HPLC oraz ich walidacja. Takie ujęcie trafniej oddaje rzeczywisty wkład naukowy Doktorantki i unika nieporozumień związanych z przypisywaniem nowatorstwa samej technice instrumentalnej.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kurpet dotyczy opracowania i walidacji trzech metod analitycznych opartych na chromatografii cieczowej z różnymi sposobami detekcji (FLD i ELSD), służących do ilościowego oznaczania niskocząsteczkowych związków siarki oraz wybranych białek osocza w próbkach biologicznych. Praca została zaplanowana poprawnie i zrealizowana zgodnie z ogólnie przyjętymi standardami w zakresie chemii analitycznej. Doktorantka wykorzystwała znane techniki instrumentalne, takie jak HPLC z detekcją fluorescencyjną oraz detekcją rozpraszania światła przez odparowanie (ELSD), stosując wcześniej derywatyzację analitów. Choć zastosowane metody nie mają charakteru nowatorskiego, ich wykorzystanie w badaniach nad biomarkerami stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w kontekście reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zakażenia SARS-CoV-2 jest uzasadnione,

ponieważ mogą stanowić relatywnie proste i dostępne narzędzie w badaniach o charakterze diagnostycznym.

Zastosowany zakres analitów, obejmujący tiolowe związki niskocząsteczkowe i białka osocza, został dobrany rozsądnie, a ich oznaczenie może dostarczyć istotnych informacji. Przeprowadzone pomiary umożliwiły obserwację zmian w stanie redoks oraz zależności między markerami biochemicznymi a możliwym ryzykiem sercowo-naczyniowym. Przeprowadzone pomiary umożliwiły ocenę zmian w równowadze oksydacyjno-redukcyjnej, a także pozwoliły na identyfikację potencjalnych zależności między wybranymi markerami biochemicznymi a ryzykiem rozwoju schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

Wszystkie opracowane procedury analityczne zostały poddane procesowi walidacji, obejmującemu ocenę parametrów takich jak liniowość, granica wykrywalności (LOD), granica oznaczalności (LOQ), precyzja, dokładność, powtarzalność oraz wpływ efektów matrycowych. Przeprowadzenie tych ocen zgodnie z obowiązującymi wytycznymi (ICH i FDA) potwierdza rzetelne i metodyczne podejście Doktorantki do części analitycznej pracy. Walidacja stanowi niezbędny element każdej wiarygodnej metody analitycznej i w tym przypadku została wykonana w sposób wystarczający, umożliwiającą zastosowanie opracowanych procedur do analizy próbek biologicznych.

W pracy warto docenić zastosowanie narzędzia AGREEprep do oceny ekologiczności protokołów przygotowania próbek. Dzięki temu Doktorantce udało się w sposób systematyczny zweryfikować aspekty związane z ograniczeniem zużycia toksycznych reagentów, materiałów jednorazowych oraz energii. Wykorzystanie AGREEprep świadczy o świadomości znaczenia zrównoważonego podejścia w badaniach bioanalitycznych, co stanowi cenny element pracy, zwłaszcza w kontekście rosnących wymagań dotyczących ekologii w laboratoriach analitycznych.

Dokonując oceny merytorycznej rozprawy doktorskiej i dyskusji wyników za najbardziej wartościowe osiągnięcie w przedstawionej pracy uznaję opracowanie metody:

- jednoczesnego oznaczania niskocząsteczkowych tioli (cysteiny, homocysteiny, cysteinyloglicyny, glutationu, kwasu α -liponowego, N-acetylo-L-cysteiny) w osoczu obok albuminy surowicy ludzkiej za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną z zastosowaniem przedkolumnowego upochnienia analitów monobromobimaniem,
- oznaczania białek takich, jak: albumina, insulina, fibrynogen, transferryna, mioglobina oraz hemoglobina w płynach ustrojowych człowieka techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją rozproszenia światła przez odparowanie,
- oznaczania różnych form *redoks* tioli - homocysteiny, cysteiny, glutationu, cysteinyloglicyny oraz γ -glutamilo-cysteiny - techniką HPLC-FLD w celu oszacowania oceny ryzyka zaburzeń sercowo-naczyniowych na skutek zakażenia wirusem SARS-CoV-2 i szczepienia przeciwko COVID-19.

Warto podkreślić, że wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w dwóch artykułach naukowych w czasopiśmie *Molecules*.

Wymienione przeze mnie osiągnięcia naukowe, uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań, z powodzeniem mogą znaleźć zastosowanie w badaniach diagnostycznych i monitoringowych, zwłaszcza w ocenie biomarkerów stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, a także w kontekście powikłań sercowo-naczyniowych związanych z zakażeniem wirusem SARS-CoV-2. Opracowane i poddane walidacji procedury analityczne, choć oparte na znanych technikach chromatograficznych, stanowią użyteczne narzędzie do ilościowej analizy wybranych tioli i białek osocza w materiale biologicznym, co może wspierać rozwój przyszłych badań klinicznych w zakresie medycyny personalizowanej, których celem jest przeniesienie wiedzy i odkryć z badań laboratoryjnych (biochemicznych) do praktyki klinicznej.

Dokonując oceny części doświadczalnej rozprawy, należy z pełnym przekonaniem stwierdzić, że Doktorantka wykazała się wysokim poziomem samodzielności w prowadzeniu prac eksperymentalnych. Zrealizowane przez nią badania charakteryzowały się zarówno poprawnością metodologiczną, jak i dużą starannością wykonania. Umiejętność planowania eksperymentów, doboru odpowiednich metod badawczych oraz ich prawidłowego zastosowania świadczy o solidnym przygotowaniu merytorycznym Pani mgr Katarzyny Kurpet. Ponadto Doktorantka udowodniła, że potrafi dokonywać trafnej i krytycznej interpretacji uzyskanych wyników, wykazując przy tym umiejętność integrowania danych pochodzących z różnych technik analitycznych. Całość działań eksperymentalnych dowodzi dojrzałości naukowej oraz zdolności do samodzielnego prowadzenia zaawansowanych projektów badawczych.

Uwagi szczegółowe

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kurpet została przygotowana w sposób staranny i czytelny. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, a opisy i grafiki są czytelne, co ułatwia zrozumienie treści. W trakcie lektury zauważyłem jednak kilka drobnych błędów redakcyjnych oraz niejasnych sformułowań, które warto byłoby poprawić. Uwagi te nie mają wpływu na ogólną ocenę pracy ani na rzetelność prowadzonych badań. Proszę więc o wyjaśnienie następujących kwestii:

- cel szczegółowy 2 – proszę o wyjaśnienie czym jest procedura analityczna i czy sposób metody przygotowania próbek może wpływać na wysoką czułość i selektywność oznaczeń wybranych analitów? Jeżeli tak, to w jaki sposób?
- dlaczego Doktorantka nie we wszystkich opracowanych metodach wykorzystała metodę dodatku wzorca wewnętrznego przy oznaczaniu analitów za pomocą chromatografii cieczowej?
- str. 79 - W jaki sposób była skonstruowana ankieta, skoro informacja w niej uzupełniona przez pacjenta budziła wątpliwości?

- str. 93, 122, 151, 185 – proszę o wyjaśnienie, dlaczego wyznaczano efekt przeniesienia próbki, skoro stosowano elucję gradientową oraz określono selektywność metody? Czy wdrożono płukanie pętli w dozowniku przed zadozowaniem kolejnej próbki?
- czy obserwowano zaburzenia linii podstawowej (dryf linii bazowej) w przypadku elucji gradientowej z zastosowaniem ELSD?
- jaka liczebność grupy kontrolnej i badanej powinna być uwzględniona w badaniach klinicznych? Czy na podstawie niewielkich grup pacjentów (15 osób) można wysuwać tak daleko idące wnioski wyniki?
- proszę o wyjaśnienie, dlaczego przy określaniu sprawności układu chromatograficznego mowa jest o kształcie pików, ale nigdzie nie ma informacji jaki był współczynnik symetrii.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, stwierdzam, że Pani mgr Katarzyna Kurpet wykazała się dużą wiedzą merytoryczną w zakresie tematyki będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej. Na szczególne uznanie zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań doświadczalnych, a także wysoki stopień samodzielności Doktorantki w realizacji poszczególnych etapów pracy – od etapu planowania, poprzez wykonanie eksperymentów, aż po analizę i interpretację wyników. Taka postawa świadczy o jej dojrzałości naukowej oraz gotowości do prowadzenia niezależnych badań. Zgromadzone wyniki mają istotny charakter aplikacyjny i mogą stanowić wartościową podstawę do dalszego rozwoju nowoczesnych metod diagnostycznych, co znacząco podnosi praktyczne znaczenie pracy i jej potencjał wdrożeniowy.

W mojej ocenie rozprawa zasługuje na wyróżnienie ze względu na wysoki poziom merytoryczny, staranność wykonania oraz nowatorskie podejście do analizowanych zagadnień. Praca wnosi istotny wkład w rozwój dziedziny i może stanowić inspirację dla dalszych badań naukowych. Oceniając całość rozprawy, należy również podkreślić, że podejmuje ona niezwykle aktualny i istotny z punktu widzenia praktyki klinicznej problem badawczy, jakim jest wpływ infekcji SARS-CoV-2 oraz szczepień przeciw COVID-19 na wybrane parametry biochemiczne u pacjentów z chorobami przewlekłymi. Tematyka ta ma nie tylko duże znaczenie dla rozwoju nauk biomedycznych, lecz również istotny wymiar społeczny i zdrowotny.

Wyrażam przekonanie, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kurpet spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w oparciu o art. 179 ust. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. *Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. 2018 poz. 1669), zgodnie z wymogami określonymi w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. 2003, Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki chemiczne o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Renata Gadziś-Kopciuk
Toruń, dnia 13 czerwca 2025 r.