



MEDICAL
UNIVERSITY
OF WARSAW

DEPARTMENT OF DRUG CHEMISTRY,
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Warszawa, 13.11.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Grysczyńskiej

**pt: ” Zastosowanie metody UPLC-ESI-MS/MS do oznaczania fenyloetanoloidów
i fenylopropanoidów w różnych układach biologicznych”**

wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Mikołajczaka

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo KKN-Nr805/2024 z dnia 17.10.2024 r., otrzymane od Przewodniczącego Rady Kolegium Nauk Farmaceutycznych prof. dr hab. Błażeja Rubisia, w którym została zawiadomiona, że Kapituła Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w uchwale 36/2024 z dnia 16.10.2024 r., powierzyła mi funkcję recenzenta w postępowaniu w sprawie nadania mgr Agnieszce Grysczyńskiej stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Mgr Grysczyńska złożyła rozprawę doktorską pt. *Zastosowanie metody UPLC-ESI-MS/MS do oznaczania fenyloetanoloidów i fenylopropanoidów w różnych układach biologicznych*. Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana promotora, prof. dr hab. Przemysława Mikołajczaka w Zakładzie Farmakologii i Fitochemii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma charakter pracy pisemnej. Została przygotowana jako monografia naukowa. Jest 112 stronicowym dokumentem, który składa się ze wstępu (20 stron) zawierającego podstawy teoretyczne podjętego tematu, celu pracy (1 strona), materiałów i metod (16 stron), wyników (24 strony), omówienia i dyskusji wyników (18 stron) oraz wniosków (1 strona). Zawiera także streszczenie w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów oraz spis piśmiennictwa, tabel i rycin.

Ocena rozprawy

Celem pracy było opracowanie dwóch metod analitycznych opartych o chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas. Pierwsza z nich obejmowała oznaczenie wybranych związków z grupy fenyloetanoloidów (*p* – tyrozolu i salidrozydu) oraz fenylopropanoidów

(rozawiny, rożyny i rozaryny) w substancjach roślinnych dwóch gatunków z rodzaju *Rhodiola* tj. różeńca górskiego (*Rhodiola rosea* L.) oraz różeńca Kiryłowa (*Rhodiola kirilowii* (Regal) Maxim), oraz w ich przetworach – liofilizowanych wyciągach wodnych i wodno-etanolowych. Druga metoda analityczna dedykowana była oznaczeniom tych samych związków oraz metabolitu *p*-tyrozolu tj. glukuronidu *p* – tyrozolu w homogenatach wątroby szczurzej.

Temat podjęty przez Doktorantkę jest aktualny. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie farmakoterapią ziołową, w tym roślinami stosowanymi w tradycyjnej medycynie chińskiej. Przykładem są rośliny z rodzaju *Rhodiola*, które od wielu lat są przedmiotem badań wielu jednostek naukowych w Polsce i na świecie. Dodatkowo, różeńiec górski (*Rhodiola rosea* L.), chętnie stosowany jest przez konsumentów w procesie suplementacji diety, co można potwierdzić mnogością dostępnych na rynku polskim preparatów, których jest składnikiem. Składniki czynne roślin z rodzaju *Rhodiola*, w badaniach wykazywały aktywność m.in. przeciwzapalną, immunostymulującą, hepatoprotekcyjną. Wykazywały także działanie adaptogenne, korygując reakcję organizmu na stres i zaburzenia homeostazy. Działanie to zmniejsza ryzyko indukowanych długotrwałym stresem chorób, między innymi układu sercowo-naczyniowego czy układu nerwowego. W ostatnich latach, rośliny z rodzaju *Rhodiola*, bada się też ze względu na ich właściwości adaptogenne, jako adjuwanty w chemioterapii i radioterapii nowotworów. Choroby nowotworowe z kolei są istotnym problemem zdrowia publicznego. Aby badania nad zastosowaniem roślin z rodzaju *Rhodiola* w medycynie były wiarygodne, należy stosować substancje roślinne oraz ich przetwory o znanej zawartości składników czynnych. W związku z koniecznością standaryzacji podawanych preparatów, zapobieganiu błędnej identyfikacji substancji roślinnej i zapobieganiu fałszowaniu, konieczne są wiarygodne metody analityczne. Jedną z nich zaproponowała w swojej pracy mgr Gryszczyńska. Wiarygodne metody analityczne niezbędne są także do oceny obserwowanego efektu fizjologicznego i/lub terapeutycznego. Po podaniu doustnym preparatu należy bowiem zweryfikować dostępność biologiczną składników czynnych, która w przypadku niektórych związków, wykazuje znaczną zmienność osobniczą. Opracowanie metody oceny stężenia związków czynnych w próbkach biologicznych (homogenatach wątrób szczurzych), także było przedmiotem przedłożonej rozprawy. W związku z powyższym uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę jest ważny dla rozwoju dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

We wstępie pracy Doktorantka zawarła podstawowe informacje o roślinach z rodzaju *Rhodiola*, o znajdujących się w nich związkach biologicznie czynnych oraz ich aktywności farmakologicznej. Jeden rozdział poświęciła także farmakokinetyce, dystrybucji narządowej oraz metabolitom związków z grupy fenyloetanoloidów i fenylopropanoidów, które stanowiły przedmiot niniejszej rozprawy. Zawarte informacje w części teoretycznej uzasadniają, dlaczego warto skupić się nad wybranymi przez Doktorantkę związkami występującymi w roślinach z rodzaju *Rhodiola*. Niemniej w związku z tym, że głównym celem pracy było opracowanie metod analitycznych, szkoda, że Doktorantka we wstępie nie zdecydowała się na wykonanie ich systematycznego przeglądu oraz nie wykazała istnienia potrzeby tworzenia nowych metod analitycznych. W obliczu ich mnogości, byłoby to zasadne. Ponadto, zarówno w części

teoretycznej, jak i później w dyskusji, Doktorantka wykonując prawidłowy przegląd piśmiennictwa, opisuje poszczególne prace, nie podejmując próby ich porównania i syntetycznego przedstawienia uzyskanych przez innych autorów wyników – jak to często robi się w pracach przeglądowych. Sprawia to, że czytelnikowi trudno poruszać się w prezentowanej tematyce. Brak opisu działania substancji roślinnych i ich przetworów, pozyskiwanych z gatunków z rodzaju *Rhodiola*, na poziomie molekularnym, który wyjaśnia zaobserwowaną aktywność biologiczną, także pozostawia pewien niedosyt.

W części praktycznej pracy nie znajdują uchybień merytorycznych. Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione sobie cele naukowe, uzyskując wyniki, które mają duży potencjał aplikacyjny. Następnie utworzone i poddane walidacji metody analityczne zastosowała w eksperymencie na modelu zwierzęcym, prowadzonym w zespole badawczym, którego była członkiem. W trakcie lektury nasunęły mi się pewne pytania, które po części wynikają z braku w rozprawie uzasadnienia podjęcia tematu badawczego. 1) Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na te dwie konkretne rośliny z rodzaju *Rhodiola*? 2) Dlaczego była konieczność stworzenia wspólnej metody analitycznej oznaczającej składniki czynne obydwu roślin? 3) Dlaczego do metody analitycznej włączony został tylko jeden metabolit i dlaczego akurat ten? 4) Czy jest uzasadnienie oznaczania go także w materiale roślinnym? 5) Jakie są elementy nowatorskie w opracowanych metodach? 6) Dlaczego zdecydowano się na opracowanie metody analitycznej dedykowanej homogenatom wątroby, a nie innym narządom czy tkankom? 7) Dlaczego jako standard wewnętrzny wybrano znakowany izotopowo tyrozol? 8) Z jakich konkretnie systemów LC-MS korzystała Doktorantka (chodzi o model)? 9) Tabela 3. 10) Jak to jest możliwe, że optymalne energie zderzeń dla dwóch różnych przejść MRM są identyczne? 11) Dlaczego w przypadku niektórych analitów nie ma drugiego przejścia MRM (pary „potwierdzenia”) – czy w tym wypadku były dodatkowe kryteria potwierdzające obecność związku w próbce? 12) Czy Doktorantka wykonała optymalizację metod analitycznych? 13) „Supernatant przeniesiono ilościowo do probówki” – proszę o wyjaśnienie, jak to technicznie było realizowane. 14) Dlaczego podczas transferu metody na inny aparat zmieniono zarówno wybrane pary MRM, jak i skład fazy ruchomej? 15) W wytycznej walidacyjnej ocenia się zmienność efektu matrycowego. Czy Doktorantka sprawdzała ten parametr? 16) Rysunek 5, I – glukuronid *p*-tyrozolu; w próbie ślepej, w czasie retencji odpowiadającemu analitowi, wydaje się być interferencja nie pozwalająca na przyjęcie proponowanego LOQ, proszę o komentarz. 17) W wytycznej walidacyjnej na którą powołuje się Doktorantka jest zapis o wymaganym stosunku sygnału do szumu dla LOQ. Czy te kryteria dla LOQ są spełnione w zaproponowanej metodzie analitycznej? 18) Tabela 10. Czy liczba próbek QC analizowanych „między dniami” nie powinna być 15? 19) „Dlatego też, ważnym aspektem badań jest przygotowanie metody analitycznej w taki sposób (...) aby mieściła się w trendzie i korelowała z doniesieniami innych badaczy” – co to znaczy? 20) W dyskusji Doktorantka wyjaśnia uzyskanie wyższego niż inni badacze LOQ, rodzajem zastosowanego systemu LC-MS – czy przypuszczenie to uzasadnia specyfikacja urządzeń? 21) W dyskusji widnieje zdanie „rozdział siarczanu *p* – tyrozolu w zastosowanych warunkach analitycznych nie umożliwił oznaczenia ilościowego tego związku w analizowanej matrycy (wątroba

szczura)”. W materiałach i metodach nie ma żadnej informacji, że związek ten był badany. Proszę o komentarz.

Praca w większości napisana jest w sposób klarowny. W kilku miejscach Recenzent miał jednak problemy ze zrozumieniem przekazu zdań. Przykładowo „W medycznej literaturze tybetańskiej opisano ją jako “Somaratsa”, “Czterotomowym Kodeksie Medycznym” i “Jing Zhu Materia Medica”, jak również w Farmakopei Chińskiej”; „W zestawieniu tym autorzy wykazali występowanie 5 związków chemicznych (...) w sześciu analizowanych gatunkach, 5 związków – w pięciu gatunkach, 12 związków – w czterech gatunkach. W znakomitej większości dany związek chemiczny występował tylko w jednym analizowanym gatunku”; P – tyrozol indukował również ochronę mięśnia sercowego przed stresem wywołanym przez niedokrwienie, co w ten sposób przyczyniło się do opracowania nowego leku w walce z chorobami niedokrwieniami serca poprzez hamowanie aktywności 5-lipoksygenazy leukocytów.”; „Uzyskane dane wskazują na różnicę w potwierdzeniu obecności w osoczu aglikonu SAL.”; „Salidrozyd, niezależnie od sposobu podania, wykryto w moczu, natomiast p – tyrozol wykryto nawet po 72 godzinach od podania.”; „rysunek ten sumarycznie pokazuje, które metabolity zostały zinterpretowane przez ten zespół badawczy.”; ”Jednym z zadań projektu było porównanie aktywności wyciągów z korzeni RK oraz kłączy z korzeniami RR otrzymanych z upraw polowych w warunkach hipoksji doświadczalnej naśladującej warunki panujące na wysokości 5000 metrów n.p.m. u szczurów”.

Doktorantka nie ustrzegła się także literówek i błędów językowych. Poruszanie się po tekście utrudniały także skąpe tytuły podrozdziałów np. pierwszym podrozdziałem części teoretycznej są „Rośliny”. Podrozdział oczywiście skupia się tylko na tych z rodzaju *Rhodiola*, niemniej tytuł mógłby sugerować trochę szersze podejście do tematu. Czytając pracę nasunęła mi się także pewna refleksja odnośnie polskich nazw opisujących terminy naukowe. W związku z tym, że językiem publikacyjnym jest z reguły język angielski, osoba przygotowująca tekst naukowy w języku polskim, stoi przed problemem- jaka nomenklatura jest właściwa. W pracy pojawiło się kilka terminów polskich związanych ze spektrometrią mas, których wcześniej nie słyszałam np. „fragmentacja jonu macierzystego do potomnego danego związku (MRM)” – zwykle tłumaczy się to jako „śledzenie wybranych reakcji fragmentacji” , „ujemnym źródle jonów” (zwykle „jonizacja w trybie jonów ujemnych”). Czy można zapytać o źródło tych terminów? Chciałabym zwrócić też uwagę Autorki, że zgodnie z definicjami słownikowymi, przeprowadzany rozdzielanie chromatograficzne, a nie rozdział. *High-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-linear trap mass spectrometry* wyjaśnione jako „Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z kwadrupolowo-liniową spektrometrią mas z pułapką ” w mojej ocenie powinno się przetłumaczyć raczej jako „wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas z analizatorem w postaci potrójnego kwadrupola z opcją liniowej pułapki jonowej”. Zamiast określenia „Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas” – powinno być „Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas” – tego typu błędy w pracy zdarzyły się kilkakrotnie, gdzie jeden człon

stanowiła nazwa techniki analitycznej, a drugi nazwa aparatu/detektora. QC tłumaczone jest z reguły jako próbka kontrolna, a nie „próbka kontrolna jakości”, mówimy raczej „oksygenaza hemowa-1 niż „oksygenaza-I hem”. „# – fragmentacja o największej intensywności” powinno być „przejście MRM o największej intensywności”. Metabolizm ksenobiotyków przebiega w dwóch fazach, warto to doprecyzować niż pisać, że w „kilku”. Dodatkowo podając wynik wydajności procesu ekstrakcji, należy podać nie tylko średnią, ale też jakiś wskaźnik zmienności np. odchylenie standardowe. Ostatnia uwaga dotyczy rysunku 4. Zaprezentowane chromatogramy są niskiej rozdzielczości i są niepodpisane, trudno więc zinterpretować prezentowane wyniki. Pomimo przedstawionych w recenzji uwag krytycznych, rozprawę doktorską oceniam pozytywnie.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Gryszczyńskiej prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022, poz. 574 z późn. zm.). Dlatego składam wniosek do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Gryszczyńskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.



Dr hab. Joanna Giebułtowa
Zakład Chemii Leków, Analizy
Farmaceutycznej i Biomedycznej
Wydział Farmaceutyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny