

Lublin, 09.11.2024

Prof. dr hab. Wirginia Kukula-Koch

Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr chem. Agnieszki Gryszczyńskiej

ubiegającej się o tytuł doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

pt.

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

Zrealizowanej pod opieką naukową Promotora, prof. dr hab. Przemysława Mikołajczaka
w Zakładzie Farmakologii i Fitochemii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Ocena formalna.

Rozprawa doktorska Pani mgr chem. Agnieszki Gryszczyńskiej została przygotowana w formie monografii. Podzielono ją na dwanaście głównych rozdziałów. Na wstępie zestawiono wykaz skrótów wykorzystywany w pracy, po którym występują wstęp, cel pracy, a następnie metodyka badawcza, wyniki i ich omówienie, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis literatury, rycin oraz tabel.

Cała rozprawa zajmuje 112 stron maszynopisu. Na uwagę zasługuje zbiór literatury naukowej obejmujący ponad 120 pozycji najnowszego piśmiennictwa.

Praca doktorska napisana jest schludnie i rzetelnie, niemniej Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich. W części teoretycznej pracy znajdują się liczne powtórzenia tych samych słów, niewielkie błędy stylistyczne, błędy w nazewnictwie związków organicznych (np. gallusan zamiast galusan, rhodiocyjanozyd zamiast rodiocyjanozyd) i pojedyncze błędy w cytowaniu kolejnych pozycji literatury (np. z inicjałem imienia „A. Panossian i wsp., 2010”, „Y. Mao i wsp., 2007”, a także powtórzenia - „Tao i wsp., (Tao i wsp., 2019) zamiast „Tao i wsp. (2019)”). W nazwach glikozydów brak jest pisanych kursywą części nazw połączeń przez atom tlenu (-O-), podobnie jak przy wskazywaniu lokalizacji podstawników (*p*-, *para*-), czy podczas odniesień do testów „*in vitro*” lub „*in vivo*”. Inicjał odkrywcy rośliny (np. L. – Linneusz) powinien pojawić się raz – na początku pracy. W dalszej jej części dodawanie go do nazw łacińskich rośliny nie jest konieczne. W przyszłych pracach pisanych w języku polskim proszę serdecznie stosować farmakopealny termin „substancja roślinna” zamiast „surowiec roślinny”.

Wstęp rozprawy doktorskiej charakteryzuje rośliny z rodzaju *Rhodiola*, ich występowanie, właściwości farmakologiczne, ciała czynne, a także zbiera informacje na temat dotychczasowych badań dostępności pojedynczych metabolitów z grupy fenyletanoidów i fenylpropanoidów w próbkach biologicznych. Ciekawym byłoby wzbogacenie opisu efektów roślin z rodzaju *Rhodiola* na organizm człowieka o wymieniane w literaturze fachowej molekularne mechanizmy działania i o aktywne dawki ekstraktów. W moim odczuciu rozdziały 2.1. oraz 2.2. mogłyby zostać uzupełnione o charakterystykę chemiczną fenyletanoidów i fenylpropanoidów. Omówienie struktury chemicznej i ugrupowań typowych dla tych metabolitów pozwoliłoby lepiej przygotować się na treści prezentowane w dalszej części pracy – dotyczące ich analizy przy użyciu detektora masowego.

Ciekawy i wartościowy jest rozdział 3 pracy, w którym Doktorantka zbiera informacje na temat sposobu oznaczania zawartości metabolitów różniące w próbkach biologicznych różnego typu, a także sposobu metabolizowania wybranych substancji po spożyciu przez zwierzęta i ludzi. Pani magister podkreśla, iż w literaturze naukowej wciąż brak jest informacji na temat metabolizmu fenylpropanoidów, co pozostawia w literaturze naukowej konieczną do wypełnienia lukę. Jedynie farmakokinetyka fenyletanoidów została już scharakteryzowana przez innych autorów.

Kolejny rozdział naświetla główne cele badawcze pracy doktorskiej Pani magister Gryszczyńskiej, to jest chęć opracowania i zwalidowania metodyki oznaczania zawartości fenyletanoidów w dwóch gatunkach różniące: *R. rosea* i *R. kirilowii*, a także opracowanie metody pozwalającej na oznaczenie tych związków i metabolitu - *p*-tyrozolu w tkankach biologicznych (w wątrobie szczurów).

Dalsza część pracy – część eksperymentalna przygotowana jest z dużą dokładnością i pozwala na powtórzenie prac badawczych przez innych badaczy. Szczególnie wysoko oceniam opisy dotyczące wszystkich przygotowywanych roztworów do analizy niezbędnych do prowadzenia analizy ilościowej i walidacji metody. Czytając opis metodyki i podrozdziały nt przygotowań do prac badawczych z łatwością można zauważyć, iż Doktorantka wypracowała bardzo solidny warsztat.

Myszę jedynie, że w opracowaniach tego typu lepiej jest korzystać z terminu „rozdzielanie chromatograficzne”, zamiast „rozdział chromatograficzny”.

Warto w tym miejscu podkreślić, że Doktorantka bardzo zgrabnie porusza się zarówno w metodyce badań analitycznych, jak i w opisach badań prowadzonych na zwierzętach i na materiale biologicznym, co świadczy o szerokiej wiedzy zdobytej podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Dalsza część pracy obejmuje przedstawienie wyników. Na kartach rozprawy pokazano dane pochodzące z walidacji metod chromatograficznych w stosunku do oznaczanych w wyciągach badanych gatunków roślin metabolitów, a także wyniki badań chromatograficznych prowadzonych na próbkach biologicznych. Po tych informacjach następuje bogata dyskusja wyników prowadzona dojrzałe i w oparciu o liczne odniesienia do stanu wiedzy i publikacji innych autorów. Dyskusję podsumowują czytelne wnioski z przeprowadzonych badań.

Mimo wspomnianych powyżej zastrzeżeń pragnę podkreślić, iż powyższe sugestie nie wpływają na moją wysoką ocenę poziomu merytorycznego niniejszej rozprawy, a praca zachowuje prawidłowy kształt typowy dla tego rodzaju dokumentów. Swoją strukturą przypomina ona układ stosowany w publikacjach naukowych, co ułatwia poruszanie się po tym obszernym tekście. Budowa pracy jest zgodna z aktualnymi wymaganiami ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 (z późniejszymi zmianami), art. 187, pkt. 3 i 4.

Podjęta tematyka badawcza i realizacja badań

Tematyka badawcza podejmowana w rozprawie doktorskiej Pani mgr Agnieszki Gryszczyńskiej wpisuje się w nurt poszukiwań efektywnych warunków analizy zawartości związków z grup fenoloetanoloidów (*p*-tyrozolu i salidrozydu) i fenylpropanoidów (rozawiny, rozyny i rozaryny) w wyciągach z dwóch wybranych gatunków rodzaju *Rhodiola*: *R. rosea* i *R. kirilowii*.

Z uwagi na szereg właściwości biologicznych tych substancji pochodzenia naturalnego i częste przyjmowanie preparatów zawierających różeńiec (w szczególności różeńiec górski) podjęta tematyka badawcza jest aktualna i ważna.

Wysoko oceniam starania Doktorantki w zakresie przeprowadzenia pełnej walidacji metody chromatograficznej – zarówno dla ekstraktów z wybranego do analiz materiału roślinnego, jak i dla homogenatów wątroby szczurów, którym podawano wyciągi z różeńca. Badania zaprezentowane na kartach rozprawy doktorskiej planowane były w prawidłowy sposób, bazując ściśle na zaleceniach i wymogach Międzynarodowej Rady ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych dotyczących Rejestracji Produktów Farmaceutycznych Stosowanych u Ludzi. Niniejsza praca w odniesieniu do parametrów, które poddano analizie jest wyczerpująca. Doktorantka poddała ocenie wiele aspektów analizy chromatograficznej, włączając m.in. badania precyzji, selektywności, liniowości, odzysku, a dla metody analitycznej dla prób biologicznych dodatkowo określając efekt matrycy, limit kwantyfikacji, efekt przeniesienia, dokładność metody i stabilność związków.

Otrzymane wyniki są obiecujące, a przedstawiona do oceny metodyka jest powtarzalna, wystarczająco czuła i gwarantuje pewność wypracowanych wyników. Eksperymenty badawcze zostały zaplanowane z należytą starannością i uwzględniają odpowiednią ilość powtórzeń do analizy statystycznej. W badaniach poprawnie wykonano krzywe kalibracyjne dla roztworów wzorcowych (bazujące na sześciu stężeniach każdego z wzorców), a także w sposób prawidłowy przygotowano próby kontrolne (ślepią próbę i próbę zerową).

Doktorantka prowadziła proces rozdzielania chromatograficznego fenyloetanoloidów i fenylopropanoidów, stosując standardowe rozpuszczalniki i ustawiając parametry pracy aparatu w taki sposób, aby umożliwić prowadzenie podobnych badań innym badaczom. Warto podkreślić, że opracowany przez Panią magister gradient rozpuszczalników był selektywny i pozwolił na rozdzielenie wielu związków w trakcie jednej analizy i w bardzo krótkiej metodzie. Czasy retencji analizowanych związków są mniejsze od 5 minut – zarówno w przypadku wyciągów roślinnych, jak i homogenatów wątroby szczurów, w przypadku których mogłyby wystąpić liczne interferencje z innymi sygnałami pochodzącymi z bogatej matrycy.

W tym miejscu chciałam spytać, czy Pani magister nie napotkała problemów z przytykaniem się kolumny chromatograficznej lub z wzrostem ciśnienia podczas prowadzonych doświadczeń. Czy zastosowanie filtrów strzykawkowych o średnicy porów 0,22 μm było wystarczające w przypadku Pani analiz?

Czy miała Pani możliwość wykonania badań kompozycji jakościowej Pani próbek z wykorzystaniem wysokorozdzielczego detektora mas – HR-MS/MS? Ciekawa jestem jakie jeszcze związki występują w Pani próbkach poza analizowanymi ilościowo w Pani doświadczeniach.

Na kartach rozprawy doktorskiej przedstawiono także wstępne wnioski dotyczące wpływu ekstrahenta na odzysk związków czynnych z matrycy roślinnej. Czy stosowała Pani także inne rozpuszczalniki niż woda i 50 % etanol? Jeśli tak, rozpuszczalnik o jakiej polarności mogłaby Pani polecić do ekstrakcji fenyloetanoloidów z korzeni różeńca.

Na uwagę i podkreślenie zasługuje fakt, iż badania zawartości wybranych metabolitów różeńca w homogenatach wątroby szczurów poddawanych warunkom hipoksji i karmionych suchymi wyciągami z obydwu gatunków różeńca są wykonywane po raz pierwszy. Niniejsze doświadczenia dostarczają cennych wyników z zakresu wpływu niedotlenienia na metabolizm salidrozydu i jego pochodnych. Doświadczenia prowadzone z wykorzystaniem materiału roślinnego i materiału biologicznego opisane na kartach tej pracy wnoszą istotne nowe informacje do dziedziny nauk farmaceutycznych i przyczyniają się bez wątpienia do rozwoju dyscypliny.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr chem. Agnieszki Gryszczyńskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 roku, poz. 742), w związku z czym zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu z wnioskiem o nadanie Pani mgr Agnieszce Gryszczyńskiej stopnia doktora w nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Wirginia Kukuła-Koch



prof. dr hab. n. farm.
Wirginia Kukuła-Koch