

# **Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum**

## **Wydział Farmaceutyczny**

Dr hab. Maria Walczak  
Katedra i Zakład Toksykologii  
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków  
e-mail: [maria.walczak@uj.edu.pl](mailto:maria.walczak@uj.edu.pl); tel. +4812/6205630

## **RECENZJA**

### **Rozprawy doktorskiej mgr Ewy Bartosińskiej**

**pt.: „Opracowanie bioanalitycznych metod oznaczania tokochromanoli w tkance tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego kobiet”**

**wykonanej w Zakładzie Farmakodynamiki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki**

**Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**

**Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

**pod kierunkiem dr hab. Danuty Siluk**

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr Ewy Bartosińskiej są naturalne substancje znane pod ogólną nazwą tokochromanoli. Doktorantka podjęła się niełatwego zadania jednoczesnego oznaczania ośmiu naturalnie występujących homologów witaminy E, w tym czterech tokoferoli ( $\alpha$ -T,  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T) oraz czterech tokotrienoli ( $\alpha$ -T3,  $\beta$ -T3,  $\gamma$ -T3,  $\delta$ -T3) w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet. Zagadnienia poruszane przez Autorkę są oryginalnym, nowatorskim podejściem badawczym, nie opisywanym do tej pory w literaturze naukowej przez innych badaczy, a ich wybór jest dobrze uzasadniony merytorycznie.

Problematyka pracy doktorskiej jest niezwykle interesująca z analitycznego punktu widzenia. Wiadomym jest, że wiarygodność oznaczeń w materiale biologicznym zależy zarówno od doboru i optymalizacji warunków przygotowania próbek do analizy, jak i od właściwie opracowanej i zwalidowanej metody bioanalitycznej. Wyzwanie to jest tym większe, im mniejsze jest stężenie oznaczanych składników w próbce. Należy pamiętać, iż w procesie przygotowania próbek do analizy trudności stwarzają składniki matrycy badanych próbek, które występują zwykle w znacznym nadmiarze w stosunku do analitów, będąc potencjalnym źródłem efektów interferencyjnych, i w konsekwencji błędów analitycznych.

Stanowiące przedmiot recenzowanej pracy doktorskiej metody jednoczesnego oznaczania ośmiu naturalnych kongenerów witaminy E w ekstraktach ludzkiej tkanki tłuszczowej pobranej z gruczołu piersiowego kobiet, z zastosowaniem detekcji masowej są oryginalne i zostały opublikowane po raz pierwszy. Dlatego też podjęte w pracy doktorskiej przez mgr Ewę Bartosińską zadanie zastosowania systemu wysokosprawnej chromatografii cieczerwnej sprzężonej z detekcją masową z jonizacją APCI lub w połączeniu z detekcją fluorymetryczną do oznaczania pochodnych witaminy E wpisują się w aktualny nurt badań, a tematyka poruszana przez Autorkę ma znaczenie praktyczne, w dziedzinach związanych ze zdrowiem człowieka, szczególnie w aspekcie potencjalnego zastosowania witaminy E w profilaktyce chorób cywilizacyjnych.

Z dorobku naukowego mgr Ewa Bartosińska wydzieliła pięć prac do doktoratu stanowiących osiągnięcie naukowe zatytułowane „*Opracowanie bioanalitycznych metod oznaczania tokochromanoli w tkance tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego kobiet*”. Zostało one przedstawione w formie komentarza do monotematycznego cyklu 3 prac oryginalnych oraz jednej poglądowej, opublikowanych w okresie trzech lat (2016 – 2018), w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, takich jak *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Talanta*, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, *Biomedical Chromatography* oraz jednego rozdziału w monografii *‘Vitamin A and Vitamin E’* wydanej przez Nova Science Publishers, Inc. w 2013 roku. Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, w czterech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Łączny współczynnik oddziaływania publikacji jest wysoki, równy  $IF = 11,157$ . Do wszystkich załączonych prac Autorka zamieściła wymagane dla tego typu opracowania stosowne oświadczenia, które jednoznacznie wskazują na jej udział w planowaniu badań, przeprowadzaniu analiz, opracowywaniu i dyskusji wyników badań oraz przygotowaniu publikacji do druku. Pragnę zwrócić uwagę, iż miejsce opublikowania wymienionych artykułów stanowi o sile zawartości merytorycznej recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska mgr Ewy Bartosińskiej stanowi obszerne opracowanie, które liczy w sumie 190 stron i składa się z sześciu rozdziałów, takich jak część teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna – skonstruowana z publikacji włączonych w rozprawę doktorską, podsumowanie i wnioski, bibliografia oraz oświadczenia współautorów. Całość opracowania poprzedzona jest spisem skrótów używanych w pracy. Rozprawa doktorska jest udokumentowana 75 przypisami literaturowymi, w zdecydowanej większości opublikowanymi po 2007 roku, ułożonymi w sposób logiczny i uporządkowany. Dysertacja

napisana jest poprawnym językiem i nie zawiera potknięć redakcyjnych. Doktorantka swobodnie posługuje się precyzyjnym językiem naukowym i adekwatnie stosuje terminologię związaną z przedmiotem pracy, a edytorska część dysertacji zasługuje na najwyższą ocenę.

**Wstęp** pracy jest napisany w sposób przejrzysty i zwięzły, a przedstawione zagadnienia poparte są bogato cytowaną literaturą. We wstępie pracy Autorka zamieściła wyczerpującą charakterystykę aktywności biologicznej związków z rodziny witaminy E, w przystępny sposób przedstawiła metody izolacji tokoferoli i tokotrienoli z matryc biologicznych i żywności oraz przybliżyła metody bioanalityczne oznaczania tokochromanoli z zastosowaniem współczesnych technik analitycznych. Wstęp dowodzi bardzo dobrej znajomości badanej problematyki, a na szczególne podkreślenie zasługuje skrupulatność, z jaką dokonała przeglądu metod analitycznych oraz sposobów ekstrakcji stosowanych do oznaczania badanych związków. Uważam, że opracowany materiał jest niezwykle przydatny dla innych badaczy zajmujących się podobną tematyką.

**W celu pracy** Autorka uzasadniła istotę i znaczenie podjętych badań oraz przedstawiła ogólne założenia pracy.

**W Części doświadczalnej** Doktorantka załącza kopie pięciu prac stanowiących rozprawę doktorską, które pozwalają na dokładne śledzenie zaplanowanych etapów badań i uzyskane wyniki. Bardzo duże wrażenie robi zakres podjętych przez Doktorantkę badań doświadczalnych. Należy podkreślić, że opracowanie metod ekstrakcji związków ze złożonego materiału, jakim jest tkanka tłuszczowa oraz optymalizacja i walidacja czułych i selektywnych metod bioanalitycznych wymagało przeprowadzenia dużej ilości czasochłonnych i pracochłonnych doświadczeń.

W pierwszej pracy, która jest rozdziałem w monografii Doktorantka przedstawiła charakterystykę fizykochemiczną, działanie biologiczne i profil farmakokinetyczny tokoferoli i tokotrienoli oraz zagadnienia związane z medycznymi i dietetycznymi aspektami suplementacji witaminą E, ze szczególnym zwróceniem uwagi jej na działanie ochronne w terapii przeciwnowotworowej.

Druga praca, o charakterze poglądowym opublikowana w Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis poświęcona jest rozwiązaniom analitycznym stosowanym do oznaczania tokoferoli i tokotrienoli w matrycach biologicznych i żywności z zastosowaniem systemów GC-MS oraz LC-MS. W opracowaniu tym bardzo szczegółowo omówiono metody

derywatywacji związków chemicznych, problematykę niedostatecznego rozdzielania chromatograficznego tokoferoli i tokotrienoli, z uwagi na podobieństwo strukturalne tych związków oraz trudności z jonizacją tokochromanoli w źródłach jonów pracujących pod ciśnieniem atmosferycznym.

Trzecia praca, o charakterze oryginalnym, opublikowana w *Talencie* dotyczyła opracowania i walidacji metody jednoczesnego oznaczania czterech tokotrienoli w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet, z zastosowaniem metody HPLC-APCI-MS/MS. Z uwagi na konieczność izolacji czterech związków w jednej próbce, w celu doboru mieszaniny ekstrakcyjnej, optymalizacji procedury ekstrakcji analitów do fazy stałej oraz wyłonienia parametrów wpływających na efektywność procesu, zastosowano nowatorskie podejście planowania doświadczeń oraz plany frakcyjne Placketta-Burmana. Na podkreślenie zasługuje fakt opracowania metod krótkich (10 min), z użyciem niewielkiej ilości próbki (100 mg) oraz zastosowania w procesie ekstrakcji związków odczynników przyjaznych środowisku. Oryginalną metodę zastosowano do pilotowego oznaczania tokotrienoli w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego u 9 kobiet obciążonych nowotworem piersi oraz zmarłych w wypadkach.

W czwartej pracy, która ukazała się w *Rapid Communication in Mass Spectrometry* skupiono się na poprawie odpowiedzi analitycznej tokoferoli i tokotrienoli w źródle jonów typu APCI, bazując na trybie śledzenia pojedynczego jonu i modelowaniu odpowiedzi analitycznej przy użyciu regresji LASSO. W efekcie finalnym nie uzyskano istotnej poprawy czułości i precyzji metody.

W pracy przyjętej do druku w *Nutrition and Cancer* opisano po raz pierwszy alternatywną metodę jednoczesnego oznaczania ośmiu tokochromanoli w tkance tłuszczowej z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorymetryczną (HPLC-FLD), uzyskując istotną poprawę czułości i precyzji metody. Do uzyskania optymalnego rozdzielania chromatograficznego zastosowano nowatorskie podejście określane jako plan centralny kompozycyjny (CCD), oceniając wpływ szybkości przepływu fazy ruchomej, temperaturę kolumny oraz procentową zawartość metanolu w fazie ruchomej na rozdzielanie chromatograficzne pomiędzy  $\delta$ -T i  $\alpha$ -T3 oraz pomiędzy  $\alpha$ -T3 i  $\gamma$ -T. W efekcie finalnym oryginalną metodę zastosowano po raz pierwszy do oznaczania stężenia pochodnych witaminy E w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego u 81 kobiet obciążonych nowotworem piersi, 8 kobiet po zabiegach chirurgii plastycznej oraz 10 zmarłych w

wypadkach, oceniając dystrybucję i stopień kumulacji konglomerów witaminy E w tej tkance. W badaniu tym, które było nowatorskie wykazano dużą zmienność międzyosobniczą w zawartości pochodnych witaminy E w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet, co ma istotne znaczenie w aspekcie rosnącego zainteresowania tokoferolami i tokotrienolami jako potencjalnymi związkami o działaniu przeciwnowotworowym.

Biorąc pod uwagę opracowanie czułych i szybkich metod równoczesnego oznaczania szerokiego spektrum pochodnych witaminy E, uzyskane przez Doktorantkę wyniki należy uznać za znaczącą nowość naukową i niewątpliwie duże jej osiągnięcie badawcze.

Pewną niedogodność stanowi brak w opracowaniu dyskusji wyników badań. Doktorantka przechodzi od razu do **Podsumowania i Wniosków**, gdzie podaje pięć wniosków dowodzących spełnienia założonych celów badawczych.

Pod względem edytorskim praca została zredagowana bardzo starannie. Pracę charakteryzuje duży ładunek naukowy oraz potencjalna wartość aplikacyjna opracowanych metod i procedur analitycznych. Uzyskane wyniki, które oceniam bardzo wysoko, świadczą o dużej samodzielności naukowej i badawczej Autorki, swobodzie poruszania się w zagadnieniach analitycznych, umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych, a także o jej dużej pracowitości i rzetelności badawczej. Uzyskane wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w obszarze bioanalizy tokochromanoli, w trudnym materiale biologicznym jakim jest tkanka tłuszczowa. Na podkreślenie zasługuje stosowanie różnorodnych technik analitycznych i różnych detektorów celem osiągnięcia jak najwyższej czułości oznaczanych analitów, co jest niezwykle istotne w przypadku oznaczania próbek klinicznych.

Podsumowując, osiągnięciem naukowym Doktorantki jest unikatowe podejście analityczne w kierunku oznaczania homologów witaminy E, jako potencjalnych czynników przeciwnowotworowych, w tym:

- opracowanie wydajnych i przyjaznych środowisku metod ekstrakcji ośmiu naturalnych tokochromanoli z tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego kobiet, przy zwróceniu szczególnej uwagi na niejednorodność pobieranego materiału biologicznego, różne poziomy stężeń w osoczu oraz zróżnicowane właściwości fizykochemiczne pochodnych witaminy E,

- opracowanie i walidacja czułych, selektywnych i szybkich metod jednoczesnego oznaczania ośmiu naturalnych tokochromanoli w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego

kobiet z zastosowaniem dwóch technik: wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją chemiczną przy ciśnieniu atmosferycznym (LC-APCI-MS/MS) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (RP-HPLC-FLD), ze wskazaniem tej ostatniej jako referencyjnej do selektywnego oznaczania wybranych tokochromanoli,

- zastosowanie metody RP-HPLC-FLD do ilościowego oznaczania po raz pierwszy wybranych tokochromanoli w próbkach tkanki tłuszczowej gruczołu piersiowego u 99 kobiet, w tym pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem piersi, kobiet zdrowych po zabiegach chirurgii plastycznej oraz kobiet zmarłych w wyniku wypadków, co jest niewątpliwą nowością tych badań, unikatową, nie wykonywaną do tej pory nigdzie na świecie.

W szerokich, dobrze zaplanowanych i konsekwentnie wykonanych badaniach, przy użyciu nowoczesnych technik analitycznych, zwłaszcza spektrometrii mas, Doktorantka wraz z Zespołem, w którym pracowała uzyskała bardzo interesujące i wartościowe wyniki o znaczeniu zarówno poznawczym, jak i aplikacyjnym. z udokumentowanym zastosowaniem w klinice. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu 2013/11/N/NZ5/00164.

Reasumując należy stwierdzić, że spójny tematycznie cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską, większościowego współautorstwa mgr Ewy Bartosińskiej w opracowaniu koncepcji, wykonaniu doświadczeń, interpretacji wyników i przygotowaniu publikacji do druku, jest oryginalnym i kompleksowym opracowaniem dotyczącym metod oznaczania konglomerów witaminy E. Badania zawierają szereg elementów nowatorskich, zostały wykonane metodycznie poprawnie, z użyciem odpowiednich narzędzi badawczych, a Doktorantka przy ich wykonywaniu i opracowywaniu wyników wykazała się odpowiednią wiedzą merytoryczną i umiejętnością samodzielnego ich prowadzenia.

Lektura przedstawionej do recenzji pracy skłania do postawienia kilku pytań, o charakterze polemicznym.

1. W moim odczuciu streszczenie powinno zawierać elementy syntetycznego opisu wyników badań.

2. Pewien niedosyt budzi nie zamieszczenie w dysertacji rozdziału poświęconego dyskusji wyników badań.

3. Zamieszczenie szczegółowego komentarza do oznaczonych stężeń ośmiu tokochochromanoli w grupie kobiet ze zdiagnozowanym nowotworem piersi, w porównaniu do kobiet zdrowych przybliżyłoby znaczenie witaminy E w profilaktyce choroby nowotworowej. Jak zinterpretować różnice w zawartości całkowitej tokochochromanoli, tokoferoli i tokotrienoli w badanych grupach kobiet?

4. Czy uzyskane wyniki korelowano ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej u badanych kobiet?

5. Czy znane są informacje na temat zastosowanego u kobiet leczenia przeciwnowotworowego?

6. Ponieważ witamina E może być gromadzona w organizmie, a jej wchłanianie w jelitach zależy m.in. od obecności tłuszczów w pożywieniu oraz dostatecznego wydzielania żółci, zatem czy znane są informacje na temat statusu społecznego kobiet, sposobu ich odżywiania się oraz współistniejących chorób i przyjmowanych leków lub suplementów diety?

7. Czy na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest ustalenie optymalnej dawki witaminy E u indywidualnej pacjentki?

8. Czy przewiduje się poszukiwania korelacji pomiędzy zawartością tokoferoli i tokotrienoli w tkance tłuszczowej gruczołu piersiowego a stężeniem tych związków we krwi kobiet?

We wniosku końcowym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, stanowiąca spójny tematycznie cykl pięciu prac pod wspólnym tytułem *„Opracowanie bioanalitycznych metod oznaczania tokochochromanoli w tkance tłuszczowej pochodzącej z gruczołu piersiowego kobiet”* w pełni odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Ewy Bartosińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą przeprowadzonych badań, uzyskania nowych, unikalnych wyników, poszerzających wiedzę na temat rozwiązań

analitycznych oznaczania konglomerów witaminy E w tkance tłuszczowej, a także ich wartość aplikacyjną oraz wyróżniający się dorobek naukowy Doktorantki, wnioskuje o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Kraków, 5 listopada 2018 r.

Katedra i Zakład Toksykologii UJ CM  
*Handwritten signature*  
dr hab. Maria Walczak  
p.o. Kierownik



Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

NARIA WALCZAK

Imię i nazwisko recenzenta

dr hab. n. farm. / ADIUNKT z hab.

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko  
doktoranta:

EWA BARTOSIŃSKA

Tytuł pracy doktorskiej:

Opracowanie bioanalitycznych metod oznaczenia  
tolochromenoli w tkance tłuszczowej pochodzącej  
z przeszłu pierośnogo lobot

#### WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Z uwagi na wysoka wartość poznawczą  
przepracowanych badań, uzyskanie nowych,  
unikalnych wyników, poszerzających wiedzę  
na temat rozkładu emalitycznych oznaczenia  
tolochromenoli w tkance tłuszczowej  
a także ich wartość aplikacyjną oraz  
wyznającą się na doświadczenia Doktorantki,  
wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy  
doktorskiej.

Maria Walczak

Katedra i Zakład Toksykologii UJ CM

dr hab. Maria Walczak  
p.o. Kierownik

### **Zasady wyróżniania pracy doktorskiej**

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

Praca doktorska może zostać wyróżniona przez Radę Wydziału poprzez podjęcie stosownej uchwały jeżeli spełnione są jednocześnie wszystkie warunki:

1. Wszyscy recenzenci pracy doktorskiej wystąpili w ramach przedłożonych pisemnych opinii z wnioskami wraz z uzasadnieniem o wyróżnienie pracy doktorskiej (załącznik nr 1). Wnioski o wyróżnienie składane w trakcie obrony pracy doktorskiej nie są rozpatrywane.
2. Po publicznej obronie wszyscy recenzenci podtrzymują (w formie ustnej) wniosek o wyróżnienie pracy.
3. Wyniki badań będących przedmiotem pracy zostały, do dnia przyjęcia pracy doktorskiej przez Radę Wydziału, ogłoszone w formie publikacji lub cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 3,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy). Doktorant w co najmniej jednej publikacji jest pierwszym współautorem. Artykuły przyjęte do druku uważa się za opublikowane.
4. Średnia wszystkich ocen z egzaminów doktorskich jest nie niższa niż 4,5 przy czym z dyscypliny podstawowej – jest ocena 5.

Rada Wydziału podejmuje uchwałę o wyróżnieniu pracy doktorskiej w tajnym głosowaniu większością  $\frac{2}{3}$  głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.

### **Zasady wyróżniania osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym**

uchwalone przez Radę WF z OML w dniu 16.09.2014 r.

Osiągnięcie naukowe może zostać wyróżnione przez Radę Wydziału poprzez podjęcie stosownej uchwały, na wniosek Komisji Habilitacyjnej powołanej do przeprowadzenia postępowania habilitacyjnego z inicjatywy wszystkich recenzentów, jeżeli wyniki badań, stanowiące osiągnięcie naukowe, będące przedmiotem postępowania habilitacyjnego zostały ogłoszone w formie cyklu publikacji w czasopiśmie o łącznym współczynniku oddziaływania (*impact factor, IF*) wynoszącym co najmniej 15,0 (wartość IF wg JCR z roku opublikowania pracy).

Rada Wydziału podejmuje uchwałę o wyróżnieniu osiągnięcia naukowego w tajnym głosowaniu, większością  $\frac{2}{3}$  głosów. Wyróżnienie następuje w dniu nadania stopnia doktora habilitowanego. Uzyskanie wyróżnienia uprawnia do ubiegania się o przyznanie nagrody naukowej Rektora GUMed.