



Zakład Bioanalityki
UNIwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin
tel. +48 81 448 65 00

prof. dr hab. Emilia Fornal
Zakład Bioanalityki
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Jaczewskiego 8b
20-090 Lublin
tel. 81 448 65 09
e-mail: emilia.fornal@umlub.pl

Lublin, 23 grudnia 2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej Marianny Kostiny-Bednarz pt. „Zmiany metabolizmu wtórnego
wybranych organizmów żywych jako źródło sygnału w pomiarach analitycznych”**

Złożona rozprawa doktorska mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz pod promotorstwem dr. hab. inż. Hanny Barchańskiej, prof. PŚ (promotorka) i dr inż. Joanny Płonki (promotorka pomocnicza) ma formę zbioru pięciu artykułów współautorskich, spójnych tematycznie, opublikowanych w roku 2023 i 2025 w czasopismach o obiegu międzynarodowym, w trzech z nich doktorantka jest pierwszym autorem, w czterech autorem korespondencyjnym. Dwie publikacje:

- Kostina-Bednarz, M.*; Płonka, J.; Barchańska, H. Allelopathy as a source of bioherbicides: challenges and prospects for sustainable agriculture. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2023, 22, 471–504;
- Płonka J.; Kostina-Bednarz, M.; Barchańska, H.* Targeted analysis, metabolic profiling, and fingerprinting based on an LC(GC)-MS approach for the comprehensive evaluation of pesticide content in edible plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2025, 1–26)

mają charakter przeglądowy.

Trzy artykuły:

- Barchańska, H.; Płonka, J.; Nowak, P.; Kostina-Bednarz, M.*¹ Metabolic profiles and fingerprints for the investigation of the influence of nitisinone on the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific Reports* 2023, 13, 1473;
- Kostina-Bednarz, M.*; Płonka, J.; Barchańska H. Metabolic profiling to evaluate the impact of amantadine and rimantadine on the secondary metabolism of a model organism. *Scientific Reports* 2023, 13, 16822;
- Kostina-Bednarz, M.*; Płonka, J.; Perkons, I.; Bartkevics, V.; Barchańska, H. Pesticides of natural origin as safer alternatives to synthetic pesticides: Identification of hinokitiol, tebuconazole and 2,4-D metabolites and evaluation of their impact on cereals. *Science of The Total Environment* 2025, 973, 179177)

prezentują wyniki badań własnych.

¹ * - autorka korespondencyjna

Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji. Po zapoznaniu się z oświadczeniami stwierdzam, że wskazują one, że wydzielone zagadnienie, prezentowane w rozprawie doktorskiej jest indywidualnym wkładem mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz. Autorka rozprawy ponadto uzupełniła swoją pracę dokorską o prezentację wyników niepublikowanych - *Rozdział 3.3. Identyfikacja biomarkerów narażenia na pestycydy w roślinach jadalnych*, s. 46-53.

W rozprawie doktorskiej mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz podjęła się wykazania, że pomiar profili metabolicznych organizmu umożliwia kompleksową ocenę skutków ekspozycji na ksenobiotyki, m.in. leki i pestycydy i może dostarczać informacji (analitycznej) niezbędnej do oceny narażenia i identyfikacji biomarkerów narażenia. Prace realizowała z wykorzystaniem organizmów modelowych, drożdży, w badaniach, w których oceniała wpływ leków, ich metabolitów oraz adiuwentu (nityzynon, amantadyna, rymantadyna, resweratrol) oraz pszenicy i jęczmienia, gdy ocenę skupiła na pestycydach i biopestycydach (tebukonazol, kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, hinokitiol, umbeliferon i skopoletyna).

Analiza profili metabolicznych jest obecnie ważnym narzędziem do oceny skutków ekspozycji organizmów na ksenobiotyki, takie jak leki, pestycydy i inne związki chemiczne. Zarówno profil metabolitów pierwotnych (aminokwasów, cukrów, lipidów), jak i metabolitów wtórnych ulega charakterystycznym zmianom w odpowiedzi na działanie tych substancji. Zmiany te tworzą swoisty „odcisk palca” ekspozycji, który można powiązać z dawką, czasem trwania narażenia oraz rodzajem wywoływanej toksyczności. W przypadku metabolizmu wtórnego, u roślin i mikroorganizmów, ksenobiotyki często indukują lub hamują biosyntezę związków takich jak fenole, alkaloidy, terpenoidy czy flawonoidy. Stanowią one czułe wskaźniki stresu, odzwierciedlając m.in. stres oksydacyjny, aktywację mechanizmów obronnych czy uszkodzenie określonych szlaków metabolicznych. Dzięki temu pomiar profili metabolitów, w tym metabolitów wtórnych, znajduje szerokie zastosowanie w toksykologii środowiskowej do oceny wpływu pestycydów i innych zanieczyszczeń na rośliny, zwierzęta wodne, bezkręgowce czy mikrobiom glebowy i wodny, a także w farmakologii i badaniach bezpieczeństwa leków, gdzie służy identyfikacji biomarkerów działań niepożądanych, takich jak hepatotoksyczność czy nefrotoksyczność. W praktyce wykorzystuje się najczęściej techniki LC-MS, GC-MS oraz NMR do globalnej analizy profilu metabolitów, a uzyskane dane poddawane są analizie wielowymiarowej, na przykład PCA lub PLS-DA, w celu wyodrębnienia metabolitów będących markerami ekspozycji i efektu biologicznego. W rezultacie metabolomika stanowi nowoczesne, bardzo czułe narzędzie umożliwiające wczesne wykrywanie zaburzeń homeostazy wywołanych ksenobiotykami oraz identyfikację potencjalnych biomarkerów toksyczności. Doktorantka zidentyfikowała interesujący obszar badawczy, dobrze zdefiniowała problem badawczy, prawidłowo wyznaczyła cele i zadania badawcze, poprawnie dobrała metody badawcze.

Złożona rozprawa doktorska mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz została opatrzona obszernym komentarzem w języku polskim, na który składa się *Wykaz skrótów i akronimów, Wprowadzenie, Przegląd literatury, Omówienie wyników badań własnych, Podsumowanie i wnioski końcowe, Bibliografia, Wykaz rysunków i tabel*. Pani mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz dołączyła również do rozprawy *Wykaz dorobku naukowego* oraz oświadczenia współautorów artykułów ujętych w cyklu publikacji stanowiących podstawę Jej dysertacji.

Na początku swojej dysertacji w *Rozdziale 1. Wprowadzenie* Doktorantka przedstawiła uzasadnienie podjęcia badań naukowych nad problematyką zmian w metabolizmie organizmów żywych w odpowiedzi na działanie związków egzogennych, przedstawiła koncepcję badań, sformułowała hipotezę główną oraz hipotezy szczegółowe, wyodrębniła etapy i zadania badawcze. Wskazała również jakie strategie analityczne wybrała do realizacji poszczególnych etapów prac. W Tabeli 1 zasygnalizowała także najważniejsze wyniki prac badawczych. Z uwagi na złożoność (kompleksowość) wykonanych prac pomocnym by było zamieszczenie w tej tabeli również informacji, w których publikacjach i których rozdziałach komentarza prezentowane są wyniki badań z tych etapów. Hipotezy zostały sformułowane prawidłowo, etapy i zadania badawcze zostały wyodrębnione trafnie.

Przegląd literatury mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz poświęciła zagadnieniom odpowiedzi metabolicznej organizmów na stres ksenobiotyczny, wykorzystaniu metabolitów wtórnych jako biomarkerów narażenia, strategiom i metodologiom analitycznym w badaniach metabolicznych oraz zastosowaniu chemometrii w analizach metabolicznych (*Rozdział 2. Przegląd Literatury*). W publikacjach przeglądowych bardzo szczegółowo omówiła zjawisko allelopatii oraz potencjał jaki ono niesie dla rozwoju biopestycydów (*Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2023, 22, 471–504) a także zastosowanie analiz celowanych i niecelowanych opartych na chromatografii cieczowej i gazowej sprzężonych ze spektrometrią mas w ocenie zawartości pestycydów w roślinach jadalnych (*Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2025, 1–2). Przegląd literatury ma logiczną strukturę i jest przejrzysty, treści zostały prawidłowo dobrane, umiejętnie zsyntetyzowane i poddane krytycznej analizie. Przegląd jest spójny z celem pracy i potwierdza dobre teoretyczne przygotowanie Doktorantki do realizacji prac badawczych. Pewien niedostatek odczuwa się jedynie w obszarze analizy doniesień dotyczących odpowiedzi metabolicznej organizmów na działanie leków, adiuwantu, pestycydów i biopestycydów, które były przedmiotem badań Doktorantki. Podobnie przy analizie wyników uzyskanych przez Doktorantkę odczuwalny jest brak ich krytycznego porównania z wynikami innych badaczy.

Prace badawcze mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz realizowała w trzech etapach. W pierwszym etapie skupiła się na biotransformacji farmaceutyków i ich wpływie na metabolom drożdży, w drugim dokonała porównania odpowiedzi metabolicznej zbóż, jęczmienia i pszenicy, na działanie pestycydów syntetycznych i naturalnych, a w trzecim na identyfikacji biomarkerów narażenia na pestycydy w roślinach jadalnych. Wyniki badań przedstawiła zwięźle w *Rozdziałach 3.1 – 3.3*. W oparciu o uzyskane wyniki opublikowała trzy prace oryginalne (*Scientific Reports* 2023, 13, 1473; *Scientific Reports* 2023, 13, 16822; *Science of The Total Environment* 2025, 973, 179177).

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* Doktorantka wykorzystwała jako model eukariotyczny do analizy zaburzeń metabolizmu aminokwasów aromatycznych - prekursorów neuroprzekazników. Opracowała i zwalidowała strategię analityczną opartą na chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, łączącą analizę celowaną z niecelowaną (metaboliczny odcisk palca), co pozwoliło Jej śledzić zarówno losy związków macierzystych, jak i ich metabolitów oraz globalne zmiany w metabolomie. W badaniach nad NTBC zidentyfikowała trzy główne produkty jego biotransformacji: ATFA, NTFA i CHD, wykazując kaskadowy szlak przemian NTBC → NTFA → ATFA. Stwierdziła, że to metabolity, zwłaszcza stabilny CHD, a nie sam NTBC, najsilniej zaburzają metabolizm wtórny, powodując znaczny spadek stężeń L-Tyr, L-Trp i

L-Phe oraz wyraźnie odmienny profil metabolomiczny, który wyraźnie uwidocznił się na wykresach rozrzutu w analizach głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*).

W drugiej części badań z wykorzystaniem drożdży Doktorantka porównała działanie dwóch pochodnych adamantanu: AMT i RMT. Wykazała, że AMT jest metabolizowany wolniej niż RMT i właśnie tą wolniejszą biotransformację wskazała jako przyczynę silniejszego i trwalszego wpływu na poziomy aminokwasów aromatycznych i amin biogennych. Profil metabolomiczny drożdży traktowanych RMT był zbliżony do kontroli, natomiast ekspozycja na AMT prowadziła do narastającej w czasie odpowiedzi metabolicznej, uwidocznionej w analizie PCA. Doktorantka zidentyfikowała także specyficzne markery narażenia: jon m/z 135 (T_R 0.9 min) dla AMT i m/z 180,2 (T_R 10.6 min) dla RMT. Niestety nie przedstawiła widm fragmentacyjnych dla zidentyfikowanych markerów, co bardzo ogranicza ich użyteczność - możliwość weryfikacji/wykorzystania markerów przez innych badaczy. Najważniejszym wnioskiem płynącym z badań z pierwszego etapu prac badawczych mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz jest potwierdzenie, że to metabolity leków, a niekoniecznie same substancje macierzyste, mogą być głównymi sprawcami zaburzeń metabolizmu wtórnego. Opracowana procedura LC-MS/MS oraz wykorzystanie drożdży jako modelu pozwoliły Doktorantce uchwycić te zależności i stworzyły podstawę do przeniesienia koncepcji badania metabolomu jako potencjalnego wskaźnika narażenia na bardziej złożone układy, rośliny uprawne.

W drugim etapie badań mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz podjęła się porównania wpływu pestycydów syntetycznych i naturalnych na metabolizm zbóż (pszenicy i jęczmienia) oraz zbadania losów tych związków w tkankach roślinnych. W tym celu rozszerzyła warsztat analityczny, obok chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas niskich rozdzielczości zastosowała chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości. W pierwszej serii doświadczeń porównała naturalny pestycyd HIN z syntetycznymi TBC i 2,4-D. Doktorantka przeprowadziła analizę celowaną aminokwasów i amin biogennych, analizę niecelowaną (metaboliczny odcisk palca) oraz identyfikację metabolitów pestycydów. Wykazała, że TBC i 2,4-D wywołują silne, trwałe zaburzenia metabolizmu zbóż, m.in. długotrwale podwyższone poziomy tyraminy i tryptaminy oraz wyraźnie odmienny profil metabolomiczny względem kontroli. Z kolei HIN powodował jedynie niewielkie i przejściowe zmiany. Doktorantka wykazała szybki spadek stężenia HIN w tkankach, wskazujący na dużą podatność związku na biodegradację. Zaobserwowała także różnice międzygatunkowe - jęczmień okazał się bardziej odporny na zaburzenia metaboliczne wywołane pestycydami syntetycznymi niż pszenica.

Dzięki zastosowaniu LC-HRMS Doktorantka zidentyfikowała dwa nowe metabolity 2,4-D oraz siedem metabolitów TBC w pszenicy, a ich kinetyka ujawniła fazowy charakter metabolizmu TBC, z metabolitami wczesnymi i późnymi. W przypadku HIN stwierdziła obecność jednego metabolitu (hinokininy), którego ilość nie zmieniała się w czasie.

W kolejnej serii doświadczeń mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz oceniała dwa związki allelopacyjne, SCOP i UMB, jako potencjalne biopestycydy, rozszerzając analizę o parametry fizjologiczne (stres oksydacyjny, zawartość chlorofilu, uszkodzenia tkanek). Doktorantka twierdzi, że metabolomiczna analiza odcisku palca wykazała, że UMB wywołuje profil bardzo zbliżony do kontroli i minimalnie zaburza

metabolizm, natomiast SCOP, mimo naturalnego pochodzenia, indukuje odpowiedź zbliżoną do syntetycznego fungicydu TBC, co sugeruje podobny mechanizm działania. Doktorantka podaje, że analiza danych LC-HRM pokazała, że UMB nie zakłóca kluczowych szlaków metabolicznych, lecz aktywuje mechanizmy obronne roślin - obserwowano wzrost stężeń wybranych kwasów tłuszczowych, auksyn i giberelin, a izoskopoletynę zidentyfikowano jako centralny metabolit koordynujący odpowiedź na UMB. Wyniki te potwierdziły pomiary fizjologiczne: rośliny traktowane UMB wykazywały niski poziom stresu i brak istotnej fitotoksyczności, podczas gdy TBC i 2,4-D wywoływały silną reakcję stresową. Niestety Doktorantka nie przedstawiła w rozprawie żadnych wyników pomiarów ani wyników analiz PCA/PLS-DA czy statystycznych dla tej serii eksperymentów (nie można ich odnaleźć w Rozdziale 3.2. ani w opublikowanych pracach P3-P5; praca doktorska nie zawiera także aneksu). Nie jest również jasne jak uzyskano listę metabolitów (Zestaw II, str.37). Nie przedstawiono żadnych danych, analizy danych, a jedynie wnioski.

Doktorantka podsumowując przeprowadzone w drugim etapie badania stwierdza: „Ta wielowarstwowa procedura analityczna potwierdziła, że profilowanie metaboliczne stanowi czułe i wiarygodne narzędzie do oceny wpływu pestycydów na organizmy żywe, umożliwiając wykrycie subtelnych zmian metabolicznych poprzedzających objawy toksyczności na poziomie fizjologicznym, co potwierdza kluczową rolę profilu metabolicznego jako czułego i wiarygodnego sygnału analitycznego.” (str.44). Wniosek ten wykracza poza zebrane i prezentowane dowody. W jaki sposób prowadzono ocenę/monitorowano zmiany metaboliczne poprzedzające objawy toksyczności na poziomie fizjologicznym? Co było wskaźnikiem wystąpienia toksyczności? Czy stosowane dawki były toksyczne dla badanych roślin?

W trzecim etapie badań mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz zastosowała opracowaną strategię metabolomiczną do analizy rzeczywistych próbek żywności, aby ocenić, czy globalna odpowiedź metaboliczna roślin może służyć jako uniwersalny wskaźnik narażenia na pestycydy. Z akredytowanego laboratorium pozyskała próbki owoców i warzyw, dla których oznaczono zawartość pozostałości pestycydów, co pozwoliło zakwalifikować próbki do dwóch grup, kontrolnej (pozostałości poniżej MRL) i badanej (pozostałości powyżej MRL). Przeprowadziła analizy LC-MS/MS celowane i niecelowane. Zmiany w stężeniach metabolitów oceniała rygorystycznie, za istotne uznawała jedynie te, które spełniały równocześnie kryteria statystycznej istotności ($p < 0,05$) i krotności zmiany ($|FC| \geq 2$). Wytypowała panel 15 uniwersalnych biomarkerów narażenia na pestycydy, których profil zmieniał się w powtarzalny sposób niezależnie od rodzaju badanej rośliny. Obejmuje on fitohormony stresu (kwas abscysynowy, salicylowy), związki fenolowe (kwas chlorogenowy, luteolina, skopoletyna) oraz poliaminy (agmatyna, putrescyna, spermidyna), co świadczy o indukcji złożonej odpowiedzi na stres wywołany działaniem pestycydów. Doktorantka wskazała, że analiza sieci korelacji ujawniła, że agmatyna i putrescyna pełnią rolę centralnych hubów regulujących odpowiedź metaboliczną, a analiza wzbogacania szlaków wykazała zaburzenia w biosyntezie aminokwasów rozgałęzionych, metabolizmie argininy/proliny i glutationu, jednoznacznie wskazując na stres oksydacyjny i zaburzenia gospodarki azotowej. Niestety analogicznie jak w przypadku oceny związków allelopatycznych - SCOP i UMB - również w tym przypadku Doktorantka nie przedstawiła wyników pomiarów ani wyników analiz PCA/PLS-DA czy statystycznych, w oparciu o które sformułowała

wnioski. Jednocześnie nie można się zgodzić z twierdzeniem Doktorantki, że „Trójwymiarowy wykres PCA na Rysunku 3 przedstawia wyraźne grupowanie się próbek w klastry odpowiadające poszczególnym gatunkom roślin (np. owoce cytrusowe, jabłka, truskawki) co potwierdziło, że opracowana metoda jest wystarczająco czuła, aby wychwycić subtelne, ale charakterystyczne dla danej matrycy odpowiedzi metaboliczne na stres wywołany pestycydami” (str. 47). Graf wskazuje tylko, że występują różnice międzygatunkowe, które uwiadcniają się w profilu metabolicznym oraz że różnice wewnątrzgatunkowe są mniejsze niż międzygatunkowe. Nie jest także jasne jak uzyskano listę metabolitów (Zestaw III, str. 37).

Konkludując przeprowadzone prace badawcze Doktorantka dokonała integracji wyników ze wszystkich etapów - od organizmów modelowych po próbki żywności - potwierdziła centralną rolę szlaku kwasu szikimowego i metabolizmu aminokwasów aromatycznych jako głównego huba odpowiedzi na stres ksenobiotyczny. Wykazała, że metabolity z Zestawów I - III tworzą spójny, silnie zintegrowany system, a nie przypadkowy zbiór związków. Wskazała, że zidentyfikowany panel 15 metabolitów stanowi realne urzeczywistnienie koncepcji wielowymiarowego wzorca metabolicznego, który w sposób uniwersalny i niezależny od substancji sygnalizuje narażenie na pestycydy. Podsumowując, opracowana przez Doktorantkę metoda ma potencjał aplikacyjny, może służyć do szybkiego, przesiewowego monitoringu bezpieczeństwa żywności, opartego na ocenie stanu fizjologicznego produktu, a nie tylko na oznaczaniu pozostałości pestycydów. Wymaga jednakże intensywnej walidacji, w tym w szczególności precyzyjnego określenia poziomu fizjologicznego markerów w roślinach nienarażonych na działanie pestycydów.

W Rozdziale 3.4. rozprawy Doktorantka dokonała krytycznej analizy wyzwań metodologicznych i strategii zapewnienia jakości danych. Zidentyfikowała dziewięć kluczowych wyzwań, które przedstawiła w formie tabeli (Tabela 2, str. 55) wraz z opisem problemu i zastosowanymi strategiami/rozwiązaniami. Jest to bardzo wnikliwa analiza i wartościowa część pracy doktorskiej. W Rozdziale 4 przedstawiła krótkie podsumowanie i wnioski końcowe z badań oraz perspektywy dalszych badań.

Lektura rozprawy mgr inż. Marianna Kostina-Bednarz nasuwa kilka pytań i spostrzeżeń, które kieruję ku uwadze Autorki.

Jako czwarte zadanie badawcze (str. 17) Doktorantka wskazała: „Identyfikacja i charakterystyka strukturalna kluczowych produktów transformacji badanych pestycydów oraz endogennych biomarkerów efektu w tkankach roślinnych, w celu pogłębionego zrozumienia mechanizmów biochemicznych leżących u podstaw obserwowanej odpowiedzi metabolicznej [P5]”. W publikacji tej (*Science of The Total Environment* 2025, 973, 179177) przedstawione są zidentyfikowane metabolity pestycydów, nie ma natomiast informacji o zidentyfikowaniu i charakterystyce strukturalnej endogennych biomarkerach efektu działania badanych pestycydów. Dyskusja ogranicza się do metabolitów, które oznaczono metodą celowaną. Bardzo proszę o przedstawienie listy zidentyfikowanych biomarkerów, wskazanie poziomu identyfikacji, przedstawienie odpowiednio widm MS i/lub MS/MS oraz chromatogramów wizualizujących czasy retencji, różnice pola powierzchni/wysokości pików pomiędzy badanymi warunkami (pestycyd vs kontrola).

Widm MS, MS/MS, chromatogramów, określenia poziomu identyfikacji brakuje również w przypadku markerów - metabolitów endogennych zidentyfikowanych (metodami niecelowanymi) również w pozostałych eksperymentach. Brak ten z jednej strony uniemożliwia ocenę przebiegu procesu identyfikacji z drugiej strony ogranicza możliwość odtworzenia uzyskanych wyników przez innych badaczy (walidację biomarkerów).

Doktorantka nie zdecydowała się również na prezentację dla większości omawianych porównań diagramów wulkanowych (ang. *volcano plots*) i grafów Venna (ang. *Venn diagram*). Brak ten jest szczególnie odczuwalny w przypadku wyników przedstawionych w rozdz. 3.3 oraz w pracy P5.

Doktorantka podczas analiz chemometrycznych (PCA, PCA-DA) skupia całą swoją uwagę niemalże wyłącznie na obserwacjach pomijając zmienne. Nie określa liczby zmiennych, w oparciu o które buduje model. Nie precyzuje czy z modeli wyklucza np. sygnały pochodzące od związku badanego oraz jego metabolitów. Nie prezentuje i nie analizuje np. wykresów ładunków (ang. *loadings plots*), wykresów udziału zmiennych (ang. *contribution plots*), wykresów ważności zmiennych (ang. VIP, *variable importance in projection*). Z tego względu niemożliwe jest przeprowadzenie pogłębionej oceny, czy wnioskowania Doktorantki są prawidłowe i poparte zgromadzonymi danymi i przeprowadzonymi analizami. Z opisów metod wynika, że Doktorantka posiada dobre teoretyczne przygotowanie, jednak sposób prezentacji wyników nie pozwala zweryfikować czy prawidłowo je zastosowała. Odczuwalny jest również brak informacji o parametrach jakości modeli (R^2 , Q^2).

W wykazie skrótów brakuje RSV.

W spisie treści brakuje Rozdziału 3.4.

Brakuje list zidentyfikowanych metabolitów, z określonym poziomem identyfikacji, potwierdzających widm i chromatogramów, wartości FC i p.

Autorka wskazuje na zastosowanie PLS-DA, OPLS-DA, VIP (str. 61), jednocześnie w tekście dysertacji nie można odnaleźć przykładów wykorzystania tych analiz.

Rozwinięcie akronimu MRM (str. 25) jest nieprawidłowo przetłumaczone na język polski.

Czy pułapka jonowa jest spektrometrem wysokich rozdzielczości (str. 25)?

Autorka pisze: „W wyniku połączenia dwóch spektrometrów mas otrzymuje się tandemowy spektrometr mas, co umożliwia uzyskanie szczególnie wysokiej rozdzielczości układu analitycznego.” (str. 30). Proszę o wyjaśnienie.

Co oznacza i na czym polega „walidacja selekcji zmiennych” (str. 56)?

Prezentacja wyników na rysunku 1SM w pracy P3 - nieczytelne słupki metabolitów o małej powierzchni piku (np. DA, NMN).

Czy do oceny liniowości krzywej kalibracyjnej R^2 jest wystarczające?

Czy niski odzysk CHD nie przyczynił się do niezaobserwowania zmian ilości CHD?

Rysunek 6a i 7a publikacja P4. Proszę o komentarz odnośnie statystycznej istotności wskazanych markerów.

Autorka pisze "In this research, RMT's advantage of high water solubility was used to enhance RSV's dissolubility and bioavailability (....) Meanwhile, the excessive solubility of RMT was properly reduced." (str. 13 artykuł P4). Proszę o wyjaśnienie.

„The CV gave precise results” (publikacja P5). Proszę o wyjaśnienie.

Nieczytelne widma na rysunku S1, S2, S3 w publikacji P5. Proszę o przedstawienie czytelnych widm oraz ich omówienie.

W publikacji P5 brakuje listy zidentyfikowanych metabolitów wg procedury opisanej w punkcie 2.6. *Post-acquisition data analysis* (Supplementary Material, str. 9-10). Proszę o przedstawienie listy zidentyfikowanych metabolitów wraz określonym poziomem identyfikacji, prezentacją widm i ich porównaniem z widmami w bazach (np. w formie odbicia lustrzanego).

W rozdziale 3.3. nie przedstawiono listy markerów wraz z określonym poziomem identyfikacji, prezentacją widm i ich porównaniem z widmami w bazach. Wyniki nie były opublikowane, nie ma więc możliwości zapoznania się z nimi. Zarówno widma, chromatogramy, grafy z analiz PCA, PLS-DA, itd. w oparciu, o które wyciągnięto wnioski dla tej serii eksperymentów powinny zostać przedstawione w dysertacji choć dla wybranych porównań, markerów.

Powyższe uwagi i spostrzeżenia choć wskazują na pewne niedoskonałości pracy doktorskiej mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz nie podważają jej ogólnej wartości merytorycznej oraz spełnienia wymogów stawianych rozprawom doktorskim.

Podsumowując, Doktorantka trafnie zidentyfikowała interesujący problem badawczy, klarownie go przedstawiła i poprawnie sformułowała hipotezę główną i szczegółowe. Właściwie dobrała metody badawcze, umiejętnie zaplanowała eksperymenty i przeprowadziła badania, które pozwoliły jej zweryfikować postawione hipotezy. Wykazała, że profil metaboliczny organizmu stanowi źródło sygnału analitycznego, który umożliwia kompleksową ocenę skutków ekspozycji na ksenobiotyki. Wykazała się umiejętnością analizy i interpretacji danych, przygotowania manuskryptów publikacji naukowych do druku oraz przeprowadzenia dyskusji naukowej.

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe fakty i argumenty stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marianny Kostiny-Bednarz pt. „Zmiany metabolizmu wtórnego wybranych organizmów żywych jako źródło sygnału w pomiarach analitycznych” przygotowana pod opieką promotorską dr. hab. inż. Hanny Barchańskiej, prof. PŚ i dr inż. Joanny Płonki spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku, poz. 1571), w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Śląskiej o nadanie Autorce stopnia doktora nauk chemicznych.