

Paweł Mateusz Nowak

Tytuł pracy doktorskiej: “Novel bioanalytical methods using the capillary electrophoresis technique”

Tytuł pracy doktorskiej w języku polskim: “Nowe metody bioanalityczne wykorzystujące technikę elektroforezy kapilarnej”

Celem badań przeprowadzonych w ramach doktoratu było rozwijanie różnorodnych metod bioanalitycznych wykorzystujących technikę elektroforezy kapilarnej połączonej z detektorem z matrycą diod (CE-DAD), oraz ocena analitycznego potencjału i stosowalności tej techniki do rozwiązywania różnorodnych problemów badawczych. Elektroforeza kapilarna jest dynamicznie rozwijającą się techniką wysokosprawnego rozdzielania mieszanin, przedstawianą jako alternatywa do szeroko stosowanej wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej. Wykorzystuje zjawisko elektroforezy, czyli wędrówki rozpuszczonych w cieczy cząsteczek obdarzonych ładunkiem pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, które zachodzi w wąskiej kapilarze krzemionkowej.

W pracy doktorskiej zostały zaprezentowane i omówione trzy typy osiągnięć naukowych: nowe metodologie, zastosowania w bioanalizie, i zastosowania w biochemii analitycznej. Jako nowe metodologie zaprezentowano innowacyjne podejścia do wyznaczania pewnych istotnych analitycznie parametrów. Jako pierwsza zaproponowana została metodologia pozwalająca na eliminację istotnego i szeroko pomijanego w rozważaniach źródła błędów systematycznych w wyznaczaniu wartości ruchliwości elektroforetycznych i elektroosmotycznych, tzw. dystorsji pola elektrycznego wiążącej się z niedostatecznym chłodzeniem kapilary podczas pomiaru. Metoda ta wykorzystuje połączenie nastrojki próbki z przeciwnych stron kapilary, jest łatwa i szybka, i może mieć szerokie zastosowanie praktyczne. Jako druga zademonstrowana została nowa metodologia wyznaczania wartości stałej dysocjacji kwasowej, oparta na znacząco ograniczonej liczbie pomiarów w stosunku do metody tradycyjnej. Okazało się, że stosując odpowiednie równanie możliwe jest wyznaczenie wartości stałej z zadowalającą dokładnością metodą dwu- lub jedno-punktową, co odpowiada liczbie buforów o danym pH które należy wykorzystać celem pomiaru ruchliwości elektroforetycznej. Skuteczność metody została potwierdzona wykonując odpowiednie modelowanie oparte na otrzymanych wartościach, obejmujące rozdzielczość, kolejność migracji, czasy migracji i nakładanie się sygnałów analitycznych od różnych związków.

Zastosowania w bioanalizie to nowe specyficzne metody rozdzielania związków małych cząsteczkowych i białek. W pracy opisano pionierskie metody pozwalające na rozdzielenie transferyny i laktoferyny ze względu na stopień wysycenia żelazem, i użyto do tego celu odmianę elektroforezy kapilarnej jaką jest micelarna elektrokinetyczna chromatografia. Po drugie opisano metodę rozdzielenia warfaryny – znanego leku przeciwzakrzepowego, i jej głównych metabolitów – hydroksywarfaryn. Udało się tego dokonać przy użyciu odpowiednio zmodyfikowanej kapilary, polegając na tzw., powlekaniu dynamicznym. Sukcesem było również jednoczesne rozdzielenie

enancjomerów wszystkich tych związków przy użyciu odpowiednio dobranego selektora chiralnego – cyklodekstryny.

Zastosowania w biochemii analitycznej to z kolei nowe metody przydatne z punktu widzenia szeroko rozumianej charakterystyki fizykochemicznej biomolekuł. Jako pierwszą omówiono metodę analizy aktywności enzymatycznej roślinnego białka błonowego odpowiedzialnego za hydrolizę chlorofilu – chlorofilazy. Spektakularnym efektem działania tego enzymu jest utrata zielonej barwy liści podczas sezonowych zmian pór roku. Użytego oczyszczonego białka rekombinowanego pochodzącego z rzodkiewnika pospolitego. Porównano dwa podejścia, tradycyjne off-line (reakcja w probówce) oraz alternatywne on-line (reakcja bezpośrednio w kapilarze). Drugie z nich okazało się być skuteczne i zapewniać dużo mniejszą konsumpcję enzymu i reagentów. Drugą metodą było kontrolowane wysycanie wspomnianego wcześniej białka – transferyny, również w podejściu off-line i on-line. Udało się wykazać, że mieszanie się nastrzykniętych do kapilary stref może następować w dwojaki sposób: elektrokinetyczny i dyfuzyjny. Badano również kwasowości ksenobiotyków (wyznaczono wartości stałej dysocjacji kwasowej pK_a), co zaowocowało charakterystyką ponad 20 pochodnych kumaryny, z których większość nie posiadała przypisanych wartości stałej dysocjacji. Szczegółowo zbadane termodynamikę dysocjacji warfaryny i 10-hydroksywarfaryny. Otrzymany obraz entalpowo-entropowy okazał się być zgodny z przewidywaniami teoretycznymi dotyczącymi charakterystyki wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego angażującego dysocjujący proton. Prowadzono również intensywne badania nad zmianami pK_a warfaryny i jej metabolitów spowodowanymi tworzeniem kompleksów z cyklodekstrynami i albuminą. Udało się wykazać istotność drobnych różnic strukturalnych w kontekście kierunku i skali zmian wartości stałej pK_a , oraz w kontekście analizy termodynamicznej (znak entalpii dysocjacji). Wyniki te otworzyły dalsze interesujące kierunki badań, wpisujące się w nurt tzw. chemii supramolekularnej.

Wyniki otrzymane w wyżej opisanych obszarach jasno pokazują, że technika elektroforezy kapilarnej jest wielofunkcyjnym narzędziem analitycznym o dużym potencjale naukowym. W pracy omówiono istotne zalety jakie oferuje: mnogość sposobów pozwalających na optymalizację metody rozdzielania, możliwość zastosowania odpowiednich środków minimalizujących błędy i przyspieszających analizę, możliwość automatyzacji i minimalizacji procedury analitycznej przez zastosowanie podejścia on-line/in-capillary, jak również połączenie zalet rozdzielania elektroforetycznego i pomiaru spektrofotometrycznego (detekcja DAD). Cechy te, jak i specyficzne podstawy fizykochemiczne – rozdzielanie zależne zarówno od wypadkowego ładunku cząsteczki jak i jej hydrodynamicznego rozmiaru, czynią elektroforezę kapilarną wysoko konkurencyjną dla innych technik, np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej. W związku z powyższym można spodziewać się dalszego rozwoju tej techniki, i przewidywać, że stanie się ona jeszcze bardziej popularnym wyposażeniem nowoczesnych laboratoriów analitycznych.

Badania związane z wysycaniem białek oraz analizą teoretyczną struktur pochodnych kumaryny prowadzono w ramach współpracy wewnątrzwydziałowej z innymi zespołami

badawczymi (prof. dr hab. Grażyna Stochel, dr hab. Mariusz Mitoraj). Badania dotyczące aktywności chlorofilazy prowadzono w ramach współpracy międzywydziałowej, z Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (prof. dr hab. Leszek Fiedor). Część prac finansowana była z projektów badawczych kierowanych przez Autora pracy, przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Iuventus Plus 2015-2017, grant IP2014 033273) oraz Narodowe Centrum Nauki (Preludium 2016-2019, grant 2015/17/N/ST4/03792).