



Gdański Uniwersytet Medyczny
**KATEDRA BIOFARMACJI
I FARMAKODYNAMIKI**

Medical University of Gdańsk
**DEPARTMENT OF BIOPHARMACEUTICS
AND PHARMACODYNAMICS**

Prof. dr hab. dr h.c. Roman Kaliszan, czł. rzecz. PAN, czł. koresp. PAU
tel. +48 58 3491493 fax: +48 58 3491962
ul. Gen. J. Hallera 107, PL 80-416 Gdańsk
e-mail: roman.kaliszan@gumed.edu.pl; web: kaliszan.gumed.edu.pl

Gdańsk, 2016-06-20

Recenzja

pracy doktorskiej mgr. Pawła Mateusza NOWAKA

pt. „Novel bioanalytical methods using the capillary electrophoresis technique”

Oceniana praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Pawła Kościelniaka, jako promotora, oraz dr. Michała Woźniakiewicza, jako promotora pomocniczego. Przeprowadzone badania były częściowo finansowane w ramach uzyskanych przez Doktoranta grantów: IUVENTUS Plus Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, PRELUDIUM Narodowego Centrum Nauki oraz European Regional Development Fund nr POIG.0 2.0100-12-0 23/08. Warto w tym miejscu dodać, że mgr Paweł M. Nowak zdobył szereg prestiżowych wyróżnień naukowych, takich jak stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla doktorantów za wybitne osiągnięcia naukowe oraz czterokrotnie roczne stypendia doktoranckie KNOW. Ponadto, uzyskał grant wspierający udział w 38th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda 2014. Jako student, Paweł M. Nowak był wyróżniony stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz stypendium w ramach programu TEAM Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Jego talent naukowy został doceniony już w szkole średniej, kiedy otrzymał stypendium Premiera (2005 r.). Jako uczeń szkoły średniej został też laureatem narodowej olimpiady biologicznej w 2007 r.

Na dysertację doktorską mgr. Pawła M. Nowaka składa się 10 oryginalnych prac doświadczalnych, opublikowanych w formie artykułów pełnotekstowych w uznanych czasopismach o obiegu międzynarodowym z zakresu nauk separacyjnych, o sumarycznym *Impact Factor* ponad 36 punktów. Wyróżniający całkowity dorobek naukowy Doktoranta uzupełnia współautorstwo 4 innych prac oryginalnych w *Journal of Chromatography A*, *Journal of Chromatography B*, *Journal of Separation Science* i *Electrophoresis* oraz pracy przeglądowej w cenionym *TrAC-Trends in Analytical*, a także autorstwo opracowania zamieszczonego w czasopiśmie stowarzyszenia doktorantów UJ. Te prace, niewchodzące w zakres doktoratu, dodają mgr. Pawłowi M. Nowakowi prawie 20 punktów IF do całkowitego dorobku publikacyjnego. Biorąc pod uwagę krótki okres pracy naukowej, osiągnięcia Doktoranta są znakomite. Zwłaszcza, że Jego wkład koncepcyjny i eksperymentalny w poszczególne badania nie budzi wątpliwości – nie tylko ze względu na przedstawione pisemne oświadczenia współautorów, ale także z uwagi na spójność tematyczną i konsekwentne zgłębianie podstaw i praktyki elektroforezy kapilarnej.

Wobec wyróżniającego się dorobku naukowego mgr. Pawła M. Nowaka, zweryfikowanego przez recenzentów o najwyższej naukowej klasie międzynarodowej, moje zadanie oceny kwalifikacji kandydata do stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk chemicznych, w zakresie chemii, jest zaszczytną formalnością.

Praca doktorska mgr. Pawła M. Nowaka została w całości opublikowana w formie 10 artykułów oryginalnych w fachowych, wysokiej rangi czasopismach chemicznych. W każdej z 10 prac składowych figuruje P. (M.) Nowak jako pierwszy autor. Dziewięć czasopism, w których opublikowano doktorat mieści się tzw. pierwszym kwartyłu (Q1) dla zakresu chemii analitycznej. Te publikacje, wraz z krótkim wprowadzeniem, zwięzłym ale wnikliwym komentarzem oraz podsumowaniem, stanowią istotę nowoczesnej rozprawy doktorskiej,

wpisującej się w standardy wiodących światowych instytucji naukowych z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych.

Dobra jest redakcja opracowania doktorskiego. Po spisie treści, liście składowych publikacji, abstrakcie, streszczeniu i zestawieniu używanych skrótów, następuje ośmiostronicowe wprowadzenie do elektroforezy kapilarnej. Część ta jest napisana zwięźle, ale zasadniczo wyczerpująco. Autor wykazuje się swobodną znajomością poruszanej problematyki chemicznej i związanego piśmiennictwa.

Z kolei, w formie tabelarycznej Doktorant podsumowuje wyniki poszczególnych prac składowych dysertacji, wymienionych chronologicznie. Jest to bardzo czytelne „wypunktowanie” istoty stawianych problemów badawczych i uzyskanych rozwiązań.

W następnej części rozprawy doktorskiej znajdują się kopie poszczególnych 10 publikacji oryginalnych, a następnie oświadczenia współautorów potwierdzające wiodącą pozycję P. Nowaka przy opracowaniu koncepcji badawczej, przeprowadzeniu doświadczeń, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptów i prowadzeniu procedury publikacyjnej.

Po publikacjach składowych rozprawy doktorskiej Autor zamieścił podsumowujący 28-stronicowy komentarz z wnioskami z przeprowadzonych badań (plus 3-stronicowy spis cytowanego piśmiennictwa). Komentarz dobrze oddaje biegłość Doktoranta w zakresie teorii i bioanalitycznych zastosowań elektroforezy kapilarnej.

Po komentarzu, Autor poświęcił 4 strony na „Supplementary Material”. Jest to raczej podręcznikowe przedstawienie podstawowych zagadnień fizykochemicznych związanych z elektroforezą kapilarną. Nie bardzo rozumiem celowość zamieszczenia tego elementarnego opisu w pracy doktorskiej. Jeśli Autor zamierzał w tym miejscu zgłębić problematykę oznaczeń pH i pK_a , to raczej powinien odnieść się do buforu wodnoorganicznego, zawierającego 15% ACN, który stosował w pracy A6. Powstaje bowiem pytanie, czy w tej pracy Autor oznaczał ostatecznie $^w pK_a$, $^s pK_a$ czy może $^s pK_a$?

Odnosząc się szczegółowo do stwierdzeń Doktoranta uznaję, że wyliczenie pK_a z dwóch danych doświadczalnych, a nawet z jednej doświadczalnej i jednej teoretycznej, nie było publikowane w przypadku elektroforezy. Jest to zatem oryginalne osiągnięcie mgr. Pawła M. Nowaka. Pozwolę sobie jednak zauważyć, że w przypadku HPLC w tzw. odwrotnym układzie faz podejście oparte o dwa przebiegi chromatograficzne było stosowane, m.in. przez zespoły Snydera i Dolana, Bosch i Rosesa, Nikitasa i Papalouisi'ego, a także Wiczlinga i mojego. Natomiast bardzo cennym innowacyjnym pomysłem badawczym mgr. P. Nowaka jest minimalizacja błędu przy oznaczaniu ruchliwości elektroforetycznej poprzez prosty zabieg, polegający na uśrednieniu wartości pomiarowych z dwóch nastryków wprowadzonych przez dłuższy i przez krótszy koniec kapilary.

Przewaga elektroforezy kapilarnej nad RP HPLC przy oznaczaniu pK_a wynika głównie z możliwości stosowania buforów wodnych, bez dodatków rozpuszczalników organicznych. Wykazanie przez Doktoranta, że kapilary o pokrytej kowalencyjnie bądź dynamicznie powierzchni zapewniają silniejsze i bardziej powtarzalne przepływy elektroosmotyczne (EOF) ma wartość poznawczą i praktyczną z punktu widzenia oznaczeń pK_a .

Zastosowanie przez Doktoranta elektroforezy kapilarnej z detekcją DAD pozwoliło na równoczesne wykorzystanie zalet rozdzielania elektroforetycznego oraz spektrofotometrii do celów oznaczania pK_a . CE-DAD z pomiarem absorbancji przy dwóch różnych długościach fali pozwala na oznaczenia pK_a bez konieczności znajomości współczynnika absorpcji analitu.

Bardzo ciekawe badania o charakterze podstawowym fizykochemicznym podjął Doktorant w pracy składowej Nr 6, poświęconej analizie zależności entalpiczno-entropicznych dla procesów równowag kwasowo-zasadowych pochodnych warfaryny. Autor porównał dwie elektroforetyczne metody oznaczania pK_a . Jedną, bazującą na pomiarach

efektywnej ruchliwości elektroforetycznej według klasycznej procedury CZE i drugą, opartą o pomiary widm absorpcji UV (CE-DAD). W zastosowanych buforach znajdował się dodecylsiarczan sodowy (10 mM) oraz acetonitryl (15% v/v). Te dodatki spowodowały podwyższenie pK_a , zarówno warfaryny jak 10-hydroksywarfaryny o 1,5 jednostek pH. Jest to racjonalna obserwacja, chociaż powstaje pytanie, jaki rodzaj pH przedstawiony jest na Fig. 2 w oryginalnej pracy? Raczej nie jest to referencyjne w° pH.

Oddzielną część pracy doktorskiej stanowią rozdzielania i oznaczenia białek transportujących żelazo: transferyny i laktoferyny. To trudne zadanie zrealizował Autor stosując elektrokinetyczną chromatografię micelną (MEKC). Dodatkowo w pracy doktorskiej opracowana została procedura oznaczania wysycenia transferyny przez żelazo.

Ekspertką sprawność analityczną w zakresie metod elektroforetycznych zademonstrował mgr P. Nowak dokonując enancjosecypicznych rozdzieleń warfaryny i jej metabolitów. Metoda wykorzystuje tworzenie układów inkluzyjnych z metylo- β -cyklodekstryną w wysokim pH. Dla pochodnych warfaryny przeprowadzone zostały oznaczenia pK_a metodami elektroforetycznymi dla pierwszego i drugiego stopnia dysocjacji. Uzyskano wartości o znaczeniu referencyjnym ze względu na eliminację wpływu na wynik końcowy siły jonowej buforu. Mechanizm dysocjacji pochodnych warfaryny, wolnych i w formie kompleksów supramolekularnych z cyklodekstryną, został przedyskutowany w kontekście wyników modelowania molekularnego przeprowadzonego we współpracy z dr. Mariuszem Mitorajem.

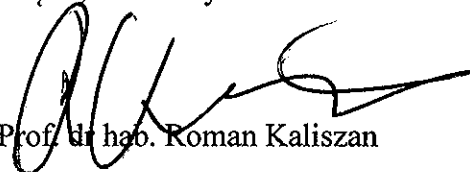
Kwasowość warfaryny została przebadana także w układach supramolekularnych z albuminą surowicy krwi ludzkiej (HSA). Wykazano, że HSA obniża o około 0,5 jednostki wartości pK_a warfaryny i jej metabolitów. Według Doktoranta, może to mieć konsekwencje farmakokinetyczne, gdyż warfaryny występują we krwi (a nie są transportowane, jak pisze Autor na str. 141) głównie w formie związanej z albuminą. Uważam, że raczej nie powinno

być takich obaw, gdyż obniżenie pK_a o 0,5 jednostki nie wpłynie na ilość farmakologicznie aktywnej formy niezdysonowanej, ponieważ pH krwi wynosi około 7,3 a rozważane warfaryny mają pK_a około 5 (W10 ma 5,95). Uwzględnienie przez Doktoranta problematyki farmakokinetycznej zasługuje jednak na uznanie.

Praca doktorska jest bardzo dobrze napisana, gdyż Autor posiadał pełne zrozumienie przedstawianych zagadnień. Także strona graficzna nie budzi zastrzeżeń. Znalazłem tylko trzy błędy typograficzne! Na str. 130 wiersz 1 od dołu (jest „changes” zamiast „change”), na str. 147 wiersz 12 od dołu (powinno być „electrochromatography”) i na str. 159 wiersz 12 od dołu (jest niezrozumiałe słowo „thereat”).

Oryginalne wyniki badawcze przedstawione w pracy doktorskiej są wyróżniające. Zawarty w dysertacji materiał, a także dorobek naukowy Autora zasługują na specjalne uznanie. Niewątpliwie przy ich pozyskiwaniu znacząca była rola wybitnych partnerów. Mgr Paweł M. Nowak jednak bardzo umiejętnie i kreatywnie wykorzystał udostępnione Mu możliwości badawcze. Dowiódł, że jest przygotowany do międzynarodowej konkurencji naukowej w zaawansowanej chemii analitycznej.

Bardzo wysoko oceniam pracę doktorską mgr. Pawła M. Nowaka i proszę Wysoką Radę Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyznaczenie terminu publicznej obrony tego doktoratu z dziedziny nauk chemicznych w zakresie chemii. W moim przekonaniu oceniana dysertacja doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawowe zaś Autor zasługuje na wyróżnienie ze względu na wartościowe wyniki, wykazanie się nieprzeciętną wiedzą i umiejętnościami analitycznymi oraz za opublikowanie wyników badań, wykonanych w ramach doktoratu, w wiodącym specjalistycznym naukowym czasopiśmiennictwie międzynarodowym.


Prof. dr hab. Roman Kaliszan