

Prof. dr hab. Marek Trojanowicz
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Laboratorium Jądrowych Technik Analitycznych
ul. Dorodna 16, 03-185 Warszawa
Tel: (22) 554 1030,
trojan@chem.uw.edu.pl

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr Pawła Mateusza Nowaka** zatytułowanej „*Novel bioanalytical methods using the capillary electrophoresis technique*” wykonanej w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Elektroforeza kapilarna (CE) jest już od ponad dwóch dekad powszechnie zaakceptowaną i szeroko stosowaną techniką rozdzielczą analizy chemicznej, konkurującą z technikami chromatograficznymi do oznaczeń bardzo wielu grup związków chemicznych. Jej możliwości rozdzielcze, przewyższające w wielu przypadkach te, które można osiągnąć w wysokosprawnej chromatografii cieczowej powodują, że jest ona szczególnie często stosowana w analizie materiałów pochodzenia biologicznego o bardzo złożonych matrycach, a w tym do oznaczania wielkocząsteczkowych biomolekuł. Zastosowaniom tym sprzyja możliwość wykorzystania różnorodnych spektroskopowych i elektrochemicznych metod detekcji, w tym również spektrometrii mas. W tym nurcie badań analitycznych mieszczą się prace publikowane w czasopismach naukowych współautorstwa mgr P. M. Nowaka, których jak na początkowe stadium działalności naukowej jest już wyjątkowo dużo. Zbiór 10 z nich został przedstawiony z dodatkowymi komentarzami Radzie Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego jako praca doktorska, promowana przez kierownika Zakładu Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UJ prof. dra hab. Pawła Kościelniaka, a na promotora pomocniczego został powołany dr Michał Woźniakiewicz z tego samego Zakładu. Jak można sądzić z życiorysu mgr P. M. Nowaka dołączonego do tekstu rozprawy, praca została wykonana w latach 2012-2016 w ramach Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii UJ, po ukończeniu studiów magisterskich przez mgr P. M. Nowaka na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w roku 2012.

Pod względem tematyki prowadzonych badań, stosowanych metodologii i instrumentacji recenzowana praca mieści się w bardzo ważnym nurcie rozwojowym współczesnej chemii analitycznej, którym jest opracowywanie nowych, wieloskładnikowych metod analizy. Badania dotyczyły trzech głównych zagadnień:

- opracowania metod CE oznaczania wybranych białek oraz warfaryny i jej pochodnych, w tym rozdzielania enancjomerów z zastosowaniem różnie podstawionych cyklodekstryn jako selektorów chiralnych,
- określania wartości stałych dysocjacji kwasowo-zasadowych metodą CE oraz ruchliwości elektroforetycznej i elektroosmotycznej,

- zastosowania chemiczne zmodyfikowanych kapilar w oznaczeniach wybranych białek oraz warfaryny i jej pochodnych.

To tematyka bez wątpienia ciekawa, chociaż jak pozwala to określić popularna baza publikacji ISI Web of Science, publikacji na temat CE i zastosowania cyklodekstryn jest już ok. 2,5 tysięcy, CE i transferyn ok. 200, CE i warfaryny – kilkadziesiąt.

Przedstawiona rozprawa zredagowana jest w języku angielskim. Wymagane ustawowo streszczenie w języku polskim jest bardzo lakoniczne. Cała rozprawa jest bardzo obszerna, bo liczy aż 163 stron, z czego 83 strony stanowią kserokopie 10 publikacji, których współautorem jest mgr P. M. Nowak, na 15 str. - przedstawione są oświadczenia o wkładzie pracy 13 współautorów (i to jest wyjątkowo liczny zespół biorący udział w przygotowaniu jednego doktoratu, w tym z udziałem aż 4 samodzielnych nauczycieli akademickich). Ostatnie 40 stron to autorski komentarz do 10 prac włączonych do rozprawy z listą 25 cytowań, wraz z listą 6 prac z współautorstwem mgr P. M. Nowaka nie włączonych do rozprawy oraz kilkoma stronami ogólnych uwag metodologicznych na temat CE.

W przypadku rozprawy stanowiącej zbiór opublikowanych prac właściwie recenzja mogłaby się sprowadzić do stwierdzenia, że ponieważ wszystkie artykuły są opublikowane w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach o bardzo dobrej reputacji – oznacza to, że były już pozytywnie zrecenzowane przez dobrych fachowców z ośrodków badawczych w różnych krajach. A dodatkowo - wszelkie ewentualne niedostatki mogli Autorzy na podstawie wskazówek recenzentów usunąć lub poprawić. Włączone do rozprawy artykuły były opublikowane w *Electrophoresis* – 2 prace, IF 2,48; w *Journal of Chromatography A* – 4 prace, IF 3,93; w *Journal of Chromatography B* – 1 praca, IF 2,69; w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* – 1 praca, IF 3,17; oraz w *RSC Advances* – 2 prace, IF 3,29.

Wydaje się więc, że w takich okolicznościach rolą recenzenta może być określenie w oparciu o obowiązującą ustawę:

1. Czy praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego (choć to właśnie jest szczególnie rygorystycznie przestrzegane w postaci koniecznego warunku autentycznej nowości naukowej w dobrych czasopismach)?
2. Czy przedstawiony zbiór publikacji jest „spójny tematycznie”, jak wymaga tego ustawa?
3. Jaki jest wymagany ustawowo „indywidualny wkład kandydata”, ponieważ wszystkie przedstawione publikacje są wieloautorskie?

Pod względem oryginalności opisanych rozwiązań w pracach włączonych do rozprawy, do tych, które uważam za jako najważniejsze osiągnięcia, zaliczam:

- opracowanie metody CE jednoczesnych oznaczeń form holo- i apo- transferyny i laktoferyny z zastosowaniem zmodyfikowanej polimerem obojętnej kapilary z wyraźną poprawą sprawności w stosunku do kapilary niemodyfikowanej i z bardzo dobrą precyzją czasów migracji (praca nr.2);

- skuteczne zastosowanie planu Doehlerta do optymalizacji warunków rozdzielania metodą MEKC form transferyny występujących w procesach wiązania żelaza i porównanie przebiegu procesu zachodzącego wewnątrz kapilary dyfuzyjnie i elektroforetycznie (praca nr. 3);
- wykazanie na przykładzie rozdzielen chiralnych hydroksywarfaryn roli istotnych zmian pK_a kompleksów z cyklodekstryną, czemu towarzyszyło również modelowanie molekularne powstających kompleksów (praca nr. 4);
- wykorzystanie różnic widm UV-Vis form sprotonowanych i niesprotonowanych do elektroforetycznego wyznaczania wartości pK_a w układzie pomiarowym z zastosowaniem detektora diodowego (praca nr. 5);
- szczegółowe zbadanie i interpretację efektów wprowadzania próbki do kapilary ze strony jej dłuższego i krótszego odcinka w stosunku do położenia detektora w handlowych rozwiązaniach konstrukcyjnych (praca nr. 8);
- przekonujące pokazanie, jak wyznaczone wartości pK_a rozdzielanych analitów, w tym wartości wyznaczone uproszczonymi metodami zaproponowanymi przez Autorów, mogą być wykorzystane do przewidywania migracji elektroforetycznej, sekwencji migracji analitów, rozdzielczości, czy też nakładania się sygnałów w pomiarach CE (praca nr.10). Ważnym osiągnięciem jest też wykazanie, że istotnym elementem w wyznaczaniu wartości pK_a metodą CE jest właściwy dobór rodzaju zastosowanej kapilary.

Lista dostrzeżonych mankamentów (lub też niejasnych dla mnie elementów) w przedstawionych publikacjach jest następująca:

1. W pracy nr.1 (krótki komunikat o oznaczaniu aktywności chlorofilazy) brak jest finalnej optymalizacji warunków oznaczania, oceny statystycznej powtarzalności czasów migracji i wielkości sygnałów oraz warunków kondycjonowania kapilary. I chociaż wspomnieli o tym sami Autorzy, faktem jest, że opublikowana praca tego nie zawiera.

2. W pracy nr. 2 nie jest dla mnie jasne, skąd jest taka duża różnica czasów migracji dla form holo- i apo- laktoferyny na Rys.1 i 2 (str. 30 i 31 rozprawy).

3. Określenie metody micelarnej MEKC, opracowanej do rozdzielania form transferyny, jako „ultraselective” przy uzyskiwanych sprawnościach, uważam za zdecydowanie przesadne (praca nr. 3, str. 38 rozprawy).

4. Nie jest dla mnie jasne, z czego wynika różnica w długościach wiązań podanych w modelach cząsteczek WAR, WAR-7-OH i WAR-10-OH na Rys.4 w pracy nr.4 i na Rys.2 w pracy nr. 5.

5. Z wyjątkiem krótkiej wzmianki w pracy nr. 5 (str.53 rozprawy) brak jest porównania wyznaczonych wartości pK_a hydroksywarfaryn z danymi z wcześniej opublikowanych prac innych autorów.

6. Nie doczytałem się, jak obserwacje zawarte w pracy nr.8 mogą być w praktyce analitycznych pomiarów elektroforetycznych wykorzystane np. do poprawy precyzji tych pomiarów, która jest przecież jedną z najpoważniejszych niedoskonałości elektroforezy kapilarnej jako techniki analitycznej.

7. Trudno mi trochę zrozumieć motywy takiego podejścia, że w streszczeniu pracy nr.9 (str. 87 rozprawy) czytamy „...allowed for the first time to separate warfarin from its six main

hydroxy-metabolites...”, i już następnej stronie Autorzy jak najbardziej poprawnie cytują pracę z 2013 roku z Georgia State University z tego samego czasopisma jako odnośnik [25], pokazującą opisane wcześniej bardzo ładne rozdzielanie elektroforetyczne tych analitów. A generalnie wprowadzenie literaturowe do tej publikacji tylko bardzo lakoniczne dotyka problemu modyfikacji kapilar do rozdzielania elektroforetycznego białek, co jest bardzo szeroko dyskutowanym tematem w literaturze. Polecam tu chociażby bardzo kompetentny przegląd z zespołu Prof. Susan Lunte z dziesiątkami wartościowych odnośników do prac oryginalnych *Anal. Meth.*, 6 (2014) 5427.

8. W pracy nr. 10 dotyczącej wyznaczania wartości stałych dysocjacji kwasowej 20 pochodnych kumaryny zabrakło mi informacji na temat precyzji prowadzonych pomiarów i jej wpływu na wyznaczone wartości, a to przecież dość newralgiczny czynnik we wszelkich zastosowaniach elektroforezy kapilarnej. Wydaje się to przecież szczególnie ważne przy jedno- lub dwu-punktowych procedurach zaproponowanych w tej publikacji.

9. Już tylko jako niezręczność redakcyjną czuję się w obowiązku recenzenta wypomnieć pisanie Autora kilkadziesiąt razy o sobie z dużej litery w omówieniu publikacji włączonych jako przedmiot doktoratu na str. 121-142. Sam tekst komentarza uważam za dobrze oddający zawartość 10 prac stanowiący przedmiot doktoratu. Cała rozprawa pod względem edytorskim przygotowana jest bardzo dobrze.

Oczekuję ustosunkowania się mgr P.M. Nowaka do tych powyższych uwag w trakcie publicznej obrony pracy.

Pod względem spójności tematycznej, uważam, że ten element rozprawy jest do zaakceptowania, chociaż zastosowanie metodologii CE do wyznaczania wartości stałych fizykochemicznych, czy parametrów ruchliwości analitów to nieco inne zagadnienie, niż optymalizacja metody analitycznej przez dobór sposobu przetwarzania próbki w kapilarze, dobór selektora chiralnego, czy też sposobu modyfikacji powierzchni kapilary. Za niefortunny uważam jednak przyjęty tytuł rozprawy. W moim przekonaniu, z ponad 30 tysięcy opublikowanych w czasopismach naukowych prac na temat elektroforezy kapilarnej (wg. ISI Web of Science, sierpień 2016), pewnie ze 2/3 dotyczy zastosowań bioanalitycznych. Przyjęcie tytułu, w którym mieści się kilkanaście tysięcy już opublikowanych prac to niezbyt fortunny pomysł.

Jeśli chodzi jeszcze o ustawowy wymóg indywidualnego wkładu kandydata w przypadku przedstawianych prac wieloautorskich, to delikatne i trudna do oceny materia. Trudno się w przypadku recenzowanej rozprawy nie zastanawiać nad rzeczywistym autorstwem włączonych prac, gdy znajduje się w oświadczeniach współautorów takie sformułowania, jak m.in. (cytuję): „*My contribution to this work includes partially the development of the concept of the major experiment, the analysis of the results and writing the manuscript*”, i dalej „*My contribution to these works includes participation in design and performance of experiments, data analysis, preparation of manuscripts*”, a szczególnie np. „*My contribution to these papers covers performing the theoretical DFT calculations on the electronic structure as well as pK_a values*”, czy też „*My contribution to these works includes application of the chemometric tools in the method optimization and data analysis*”. Trudno więc sobie wyrobić tu zdanie na temat autorstwa prezentowanych w rozprawie osiągnięć, a sam Autor bardzo

lakońicznie wspomina tylko o współautorstwie w komentarzu do przedstawianych prac. Nie mogę się też oprzeć refleksji, że w mojej opinii znacznie korzystniej dla całego kształtu rozprawy, byłoby włączyć do niej prace z bardziej ograniczoną liczbą współautorów i z bardziej jednorodną tematyką.

Konkludując – zawarłem w swojej recenzji kilka uwag krytycznych pod adresem Autora rozprawy, dotyczących głównie formy przedstawienia własnych osiągnięć, ich oceny na tle istniejącej literatury oraz kwestii autorstwa wszystkich dyskutowanych osiągnięć. Wprawdzie technika CE ma już generalnie za sobą okres, kiedy niemal powszechnie uważano, że zastąpi ona kompletnie metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej, lecz niewątpliwie mgr P. M. Nowak jest nią zafascynowany i niczego lepszego nie można sobie wyobrazić w przypadku młodego naukowca, a efektem tego jest już raz pokreślony wybitny dorobek publikacyjny na tym etapie drogi zawodowej. Nie do końca rozumiem dlaczego spośród 15 prac opublikowanych w dobrych, lub wręcz bardzo dobrych, recenzowanych czasopismach międzynarodowych, w żadnej z nich mgr P. M. Nowak nie jest autorem korespondencyjnym. Szczególnie, gdy we wszystkich jest pierwszym autorem z całego, bardzo dużego grona współautorów.

Samą rozprawę oceniam pod względem zawartości merytorycznej jako wyróżniającą się, co jest jednoznaczne z moim wnioskiem o jej wyróżnienie kierowanym do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Uzasadniam ten wniosek rozległością poruszanej tematyki badawczej, nowoczesnością podejścia badawczego i bardzo wnikliwą interpretacją obszernego materiału doświadczalnego. W świetle moich własnych doświadczeń w zakresie elektroforezy kapilarnej, za najbardziej oryginalne i nowatorskie elementy badań Autora uważam bardzo szczegółowe zbadanie i interpretację efektów wprowadzania próbki do kapilary ze strony jej dłuższego i krótszego odcinka w stosunku do położenia detektora w handlowych rozwiązaniach konstrukcyjnych oraz dogłębne zbadanie efektów, a w szczególności strukturalnych, różnicowania wartości stałych dysocjacji kwasowo-zasadowej kompleksów enancjomerów analitów z selektorami chiralnymi, szczególnie w świetle znaczenia tego efektu dla pomiarów metodami elektroforezy kapilarnej, co w sumie było przedmiotem aż pięciu opublikowanych prac (i mogło samo stanowić przedmiot rozprawy doktorskiej).

W świetle obowiązującego ustawodawstwa dotyczącego nadawania stopni naukowych uważam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr P.M. Nowaka do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy

20 sierpnia 2016

