

prof. dr hab. Rafał Głowacki
Katedra Chemii Środowiska Wydziału Chemii UŁ
90-236 Łódź, ul. Pomorska 163
rafal.glowacki@chemia.uni.lodz.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Grochockiego pt:

Metody zwiększania czułości elektroforezy kapilarnej w analizie próbek biologicznych

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Michała Markuszewskiego

w Zakładzie Biofarmacji i Farmakokinetyki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kapilarne techniki elektromigracyjne zaliczane są do komplementarnych w stosunku do technik chromatograficznych. Bardzo często używa się określenia „techniki siostrzane” w kontekście rozdzielania prowadzonego w obydwu przypadkach w fazie ciekłej. Znane są hybrydy obydwu technik, takie jak np. kapilarna elektrochromatografia (CEC) czy micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC). Jeszcze nie tak dawno uważano, że kapilarne techniki elektromigracyjne wyprą wszechobecne dzisiaj techniki chromatograficzne, wskazując na zalety takie jak bardzo dobra rozdzielczość, krótki czas analizy, podatność na miniaturyzację czy względnie niski koszt zakupu aparatury. Im bardziej jednak zagłębiano się w możliwości aplikacyjne metod opartych o kapilarną elektroforezę (CE), tym więcej problemów pojawiało się do rozwiązania. Szczególnie w przypadku złożonych matryc, jakimi są próbki biologiczne, wykazano największe ograniczenia. Za typowe i najbardziej uciążliwe uznaje się obecnie w CE niską czułość stężeniową w przypadku stosowania klasycznego detektora UV-Vis oraz słabą powtarzalność czasów migracji. Rozwiązania techniczne polegające na stosowaniu specjalnych kapilar, czy też wyrafinowanych celek detekcyjnych, tylko w niewielkim stopniu pomagają zniwelować różnice w czułości pomiędzy CE i technikami chromatograficznymi. Inwestując znacznie więcej można ominąć ten problem, poprzez zastosowanie czułych detektorów mas. Innym sposobem może być przeprowadzenie analitów w pochodne. Znacznie tańszym, a równie efektywnym rozwiązaniem może być

zastosowanie różnych technik zatężania analitów, bezpośrednio w układzie pomiarowym. Rozwiązanie to od wielu lat zyskuje na popularności, skutecznie ograniczając w wielu przypadkach problem niskiej czułości stężeniowej, bez angażowania kosztownych sposobów detekcji. Opis takiego podejścia zawiera przedstawiona do recenzji praca Pana Wojciecha Grochockiego.

Opracowanie posiada formę cyklu spójnych tematycznie publikacji, zamieszczonych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Są to: *Journal of Chromatography A* (2), *Analytical Chemistry* (1), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (1) oraz *Molecules* (1). Są to prace trzynazwiskowe w czterech przypadkach oraz jedna praca czteronazwiskowa. Na początku opracowania Autor umieścił spis stosowanych skrótów oraz dość długie, obejmujące 32 strony wprowadzenie. Umieszczone w centralnej części opracowania publikacje zostały każdorazowo poprzedzone dwustronicowym streszczeniem, zawierającym najważniejsze dla zrozumienia problemu informacje. W końcowej części materiałów przekazanych do recenzji znajdują się czterostronicowe podsumowanie oraz oświadczenia współautorów, z których wynika znaczący udział Doktoranta w przeprowadzonych pracach badawczych. Na końcu Autor zawarł spis cytowanej literatury w liczbie 53 pozycji. Taki układ pracy pozwala na szybkie i sprawne poruszanie się po zawartości, bez konieczności sięgania do zbędnych odsyłaczy. Jak wynika z oświadczeń, głównym pomysłodawcą jak również projektantem eksperymentów w czterech pierwszych pracach był profesor Joselito P. Quirino, w którego zespole Doktorant miał okazję terminować. Udział Pana Wojciecha Grochockiego polegał na wykonaniu eksperymentów, rejestrowaniu i kolekcjonowaniu wyników, przygotowywaniu rysunków oraz współtworzeniu manuskryptów. Był więc to niewątpliwie udział znaczący, a biorąc pod uwagę stopień trudności i czasochłonność wykonywania poszczególnych eksperymentów, decydujący w kontekście powodzenia przedsięwzięcia. W ostatniej załączonej pracy Doktorant był także współtwórcą koncepcji badań. W tym miejscu należy podkreślić komfortowe okoliczności w jakich Doktorantowi przyszło prowadzić badania. Z jednej strony wsparcie merytoryczne promotora, profesora Michała Markuszewskiego, specjalisty w dziedzinie bioanalizy, z drugiej zaś pomoc eksperta w dziedzinie technik elektromigracyjnych, profesora Quirino. Nie da się ukryć, że Doktorant wykorzystał ten fakt w 100%.

Wprowadzenie do opracowania zawiera szereg informacji z zakresu teorii i podstaw technik elektroforetycznych oraz szczegółowy opis najczęściej wykorzystywanych technik zatężania analitów w tzw. trybie *on-line*. Są to: wzbogacanie analitu we wzmocnionym polu

elektrycznym (FASS/FESS), wprowadzanie próbki we wzmożonym polu elektrycznym (FASI/FESI), spiętrzanie próbki na drodze dynamicznego skrzyżowania pH, zmiatanie, spiętrzanie analitów na drodze rozpadu miceli (AFMC), spiętrzanie analitów na drodze destabilizacji miceli za pomocą rozpuszczalnika organicznego (MSS) i kilka innych. O ile szczegółowy opis poszczególnych trybów zateżania był trafnym posunięciem, gdyż ułatwia czytelnikowi zrozumienie mechanizmów opisanych w załączonych publikacjach, o tyle informacje zawarte na samym początku, traktujące o podstawach CE mogły zostać pominięte bez uszczerbku dla wartości całego opracowania. Niemniej, chciałbym podkreślić, że wspomniany wstęp literaturowy został napisany bardzo klarownie i nawet mniej zorientowany w tematyce czytelnik nie powinien mieć trudności ze zrozumieniem jego zawartości.

Głównym celem prowadzonych badań było opracowanie metod, bazujących na ogólnodostępnej aparaturze do CE, w których poprawa granic oznaczalności następuje w wyniku zateżania analitów w trybie *on-line*, bądź też w wyniku zastosowania innej niż UV-Vis, ale niekoniecznie kosztocłonnej detekcji mas.

Meritum opracowania stanowi pięć publikacji, których zakres tematyczny daje się podzielić na dwie zasadnicze części. Pierwsza z nich, obejmująca trzy pierwsze publikacje dotyczy możliwości łączenia różnych technik zateżania analitów bezpośrednio w układzie pomiarowym. W tym zakresie Doktorant opisał zakończone sukcesem próby połączenia w jednym toku analitycznym technik FASI, zmiatania i MSS. Celem takiego zabiegu było zwiększenie współczynnika wzmożenia czułości (SEF), a tym samym obniżenia granic wykrywalności i oznaczalności konkretnych analitów. Uzyskano znakomity wynik, a mianowicie SEF sięgający prawie 6500, co oznaczało, że jest to wartość wyższa ponad 161 razy w porównaniu do samego FASI. Co jednak najważniejsze, przeprowadzone eksperymenty umożliwiły zaproponowanie wiarygodnego mechanizmu rozdzielania. Po częściowej walidacji, która obejmowała określenie zakresu liniowości, granic wykrywalności i oznaczalności, dokładności i precyzji metodę aplikowano do próbek surowicy krwi na okoliczność oznaczania pięciu kationowych substancji leczniczych. Fakt wyboru substancji o takich samych właściwościach fizykochemicznych wynikał z ograniczeń metody, co dało impuls do dalszych badań w tym zakresie, wyniku których opracowano podobną procedurę, umożliwiającą oznaczanie w surowicy także substancji anionowych. Istotną nowością było zastosowanie kapilary ze zmodyfikowaną powierzchnią wewnętrzną, co umożliwiło zmniejszenie przepływu elektroosmotycznego (EOF), a w konsekwencji efektywne, choć kilkukrotnie mniejsze w porównaniu z kationowymi, zateżenie analitów anionowych. Podobnie jak w poprzednim

przypadku, po walidacji metody, z sukcesem aplikowano ją do próbek surowicy krwi, tym razem w celu oznaczenia penicylin.

W kolejnej publikacji opisano próby zastąpienia toksycznego acetonitrylu, stosowanego w technice MSS, roztworem cyklodekstryn. Badania zakończyły się sukcesem, a po uwzględnieniu mechanizmu, technikę określono mianem spiętrzania analitów na drodze destabilizacji miceli za pomocą cyklodekstryn (MCDS). Stanowi to bardzo duże osiągnięcie w kontekście opracowania nowej techniki, natomiast samo argumentowanie co do konieczności wyeliminowania acetonitrylu wydaje się nieco na wyrost, jeśli uwzględni się ilości rozpuszczalników/roztworów wykorzystywanych w CE. Niemniej, wartość uzyskanych wyników jest bardzo duża i otwiera nowe możliwości w badaniach proteomicznych.

Druga część badań obejmowała udane próby opracowania procedur analitycznych opartych o CE, które umożliwiały oznaczanie w próbkach moczu jonów octanowych i kreatyniny w pierwszym przypadku oraz związków o budowie pterynowej w drugim. W obydwu przypadkach zastosowano odmienne sposoby detekcji, a mianowicie oparte o bezkontaktowy detektor konduktometryczny (C4D) i detektor fluorescencji wzbudzonej LED (LEDIF). Zastosowano klasyczne podejście na etapie optymalizacji warunków rozdzielania, testując różne bufony i warunki pH, względnie rozcieńczanie próbek. Obydwie procedury poddano walidacji i z sukcesem aplikowano do próbek moczu pochodzących od zdrowych dawców oraz pacjentów onkologicznych (pteryny).

Z punktu widzenia wartości merytorycznej jakość uzyskanych wyników oceniam bardzo wysoko. Zarówno od strony metodologicznej jak i zbadanych mechanizmów rozdzielania uzyskane wyniki stanowią bardzo istotny wkład w rozwój technik elektromigracyjnych. Doktorant wykazał się nie tylko doskonałą znajomością techniki analitycznej, ale również umiejętnością wyjaśniania skomplikowanych mechanizmów przebiegających w kapilarze. Co więcej, każdorazowo wykazał użyteczność opracowanych procedur, aplikując je do próbek rzeczywistych, co nierzadko jest zadaniem bardzo trudnym, albo wręcz niemożliwym w przypadku technik elektromigracyjnych.

Opracowanie stanowiące wstęp do załączonych publikacji jak i komentarze do nich zostały napisane bardzo starannie, a Autor posługuje się zrozumiałym, łatwym w odbiorze językiem. Uważna lektura ujawnia niewielką liczbę błędów edytorskich oraz pewne nieścisłości nomenklaturowe, np. niepoprawne używanie określeń/nazw „dodecylosiarczan sodu” zamiast „sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego” czy „fluorochrom” zamiast „fluorofor”. Zgodnie ze słownikiem *Chromatografia i Techniki Elektromigracyjne* WNT, BGE

powinno się określać mianem elektrolitu podstawowego, a nie buforem elektroforetycznym. Powyższe drobne uchybienia w żadnym stopniu nie wpływają, w mojej opinii, na ogólną bardzo wysoką ocenę pracy.

Za najważniejsze osiągnięcia Pana Wojciecha Grochockiego w zakresie przeprowadzonych badań uważam:

- kompleksowe opracowanie, opisanie mechanizmu i aplikację do próbek biologicznych nowej techniki zateżania analitów w kapilarze wykorzystującej technik FASI, zmiatania oraz MSS,
- nowatorskie wykorzystanie cyklodekstryn jako skutecznej alternatywy dla acetonitrylu w technice MCDS oraz kompleksowe opisanie mechanizmu rozdzielania,
- praktyczne wykorzystanie mniej znanych sposobów detekcji, w tym C4D oraz LEDIF, do oznaczania biologicznie ważnych związków w złożonych matrycach.

W podsumowaniu stwierdzam, że cel postawiony na wstępie pracy został w pełni osiągnięty, a przedstawiona mi do recenzji praca „*Metody zwiększania czułości elektroforezy kapilarnej w analizie próbek biologicznych*” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim przez *Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku; Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.*. Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr. Wojciecha Grochockiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę fakt, że praca swoim zakresem oraz jakością wykracza poza typowe standardy przyjęte dla tego typu opracowań oraz, że zawarte w niej wyniki zostały w całości opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o jej wyróżnienie.

