



dr hab Piotr Mucha, prof. UG

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Wita Stwosza 63, Gdańsk 80-308
tel. 0585235432, e-mail: piotr.mucha@ug.edu.pl

Gdańsk, 21.12.2020 r.

Ocena dorobku naukowego dr Natalii Miękus-Purwin „Nowe podejścia analityczne do oznaczania wybranych amin biogennych w próbkach biologicznych jako biomarkerów wytypowanych jednostek chorobowych”

dr Natalia Miękus-Purwin w 2011 r. uzyskała tytuł magistra farmacji na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku wykonując (co zasługuje na podkreślenie) pracę magisterską “Generation of antibodies specific for the phosphorylated form of indoleamine 2,3-dioxygenase, a master regulator of the immune system” w Università degli studi di Perugia, Departament Medycyny Eksperymentalnej i Biochemii, a w 2015 r. uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego broniąc rozprawy doktorskiej „Optymalizacja metod bioanalitycznych podczas oceny potencjalnych biomarkerów nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego” której promotorem był prof. dr hab. Tomasz Bączek. Jak wynika z prezentacji osiągnięć przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne, tematyka badawcza, którą Natalia Miękus-Purwin zapoczątkowała w trakcie badań w ramach dysertacji doktorskiej, była następnie kontynuowana. Obecnie dr Natalii Miękus-Purwin zajmuje stanowisko adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej GuMed.

Ocena dorobku naukowego dr Natalii Miękus-Purwin przedstawionego jako osiągnięcie habilitacyjne

W ramach wniosku habilitacyjnego Kandydatka przedstawiła cykl 6-ciu powiązanych tematycznie publikacji, których problematyka dotyczy opracowania nowych analitycznych metod elektroforetycznych połączonych z wzbogacaniem i izolacją analitów w złożonych matrycach biologicznych. Obiektem badań Kandydatki były związki z grupy amin biogennych (DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp) i ich metabolity, które wykorzystywane były jako markery stanów patologicznych-procesów nowotworowych czy udaru mózgu. W przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne pracach Kandydatka słusznie zastosowała strategię oznaczania szerokiego spektrum biomarkerów wychodząc z założenia, że sytuacja w której stan patologiczny jest charakteryzowany biochemicznie przez pojedynczy marker jest rzadka. Kandydatka wykorzystywała w swoich badaniach technikę elektroforezy kapilarnej (CE) do oznaczania profilu wybranych biomarkerów. Ta nowoczesna technika analityczna świetnie nadaje się do oznaczania małowcząsteczkowych kationów jakimi są oznaczane przez Kandydatkę biomarkery. Niestety technika ta charakteryzuje się ograniczoną czułością poprzez stosowanie kapilar o małych przekrojach wewnętrznych (standardowo i.d. 75 μm). Z tego punktu widzenia niezwykle wartościowe są uzyskane przez kandydatkę wyniki dotyczące zatężania analitów *off i on line*, co umożliwia zwiększenie czułości analiz. Problem ten

jest szczególnie istotny w oznaczeniach analitów z próbek, których składnikiem są złożone matryce biologiczne. W ramach osiągnięcia habilitacyjnego Kandydatka zaprezentowała 6 publikacji (H1-6), z czego publikacje H1-5 są publikacjami eksperymentalnymi, a H6 jest pracą przeglądową. Publikacje H1-6 są pracami wieloautorskimi opublikowanymi w latach 2016-2020. Liczba prac nie jest duża, ale opublikowano je w dobrych i bardzo dobrych czasopismach o profilu analitycznym z listy JCR. Sumaryczny współczynnik wpływu IF wynosi 25,6, co daje średnią wartość ok. 4,3 na publikację. Kandydatka podaje tylko całkowitą liczbę cytowań wynoszącą 68-78 (w zależności od źródła), co jest wartością znaczącą i pokazuje, że prace Kandydatki wnoszą istotny wkład w rozwój nauki. Kandydatka nie podaje informacji nt. liczby cytowań prac H1-6. Jednakże analiza bazy Scopus (na dzień 21.12 2020) pokazuje, że liczba cytowań tych prac wynosi odpowiednio 17,2,7,3,0,7-w sumie 36. Pokazuje to, że publikacje zaliczone przez Kandydatkę do osiągnięcia habilitacyjnego zostały zauważone w środowisku naukowym, a uzyskane dane są wykorzystywane w badaniach związków biologicznie aktywnych z wykorzystaniem technik elektroanalitycznych (Praca H5 nie ma cytowań gdyż została opublikowana w 2020 r.). Parametry bibliometryczne w postaci liczby cytowań (36 po doktoracie, 68(78)–całkowity) oraz indeks Hirscha równy 6, mieszczą się w zwyczajowych granicach wniosków o stopień naukowy dra habilitowanego.

Deklarowany udział Kandydatki w publikacjach H1-6 jest znaczący. W pracach H1-3 jest on dominujący (40-80%), jedynie w pracy przeglądowej H6 jest nieco niższy (30%). W 5-ciu z tych prac (z wyjątkiem H6) Kandydatka jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich (H4, H5) autorem korespondencyjnym. Pokazuje to dominujący wkład Kandydatki w badania opisane w tych publikacjach. Kandydatka deklaruje w nich szeroki wkład merytoryczny, począwszy od postawienia hipotezy badawczej, zebranie i przygotowanie próbek do analizy, wykonanie eksperymentów analitycznych, a skończywszy na analizie otrzymanych danych, opracowaniu i edycji manuskryptu. Świadczy to o dojrzałości naukowej i samodzielności Kandydatki. Prace będące osiągnięciem habilitacyjnym Kandydatki zawierają wartościowe wyniki pozwalające na rozwój analitycznych technik elektromigracyjnych w zastosowaniu do charakterystyki wybranych stanów patogennych poprzez optymalizację technik izolacji i prekoncentracji wybranych markerów. Podejście to stanowi próbę rozwiązania problemu bioanalitiky małowzrostkowych związków silnie hydrofilowych bądź jonowych występujących w niewielkich stężeniach w złożonych matrycach biologicznych. Wykorzystanie w tym celu elektroforezy kapilarnej w różnych jej wariantach jest ze wszech miar dobrą ideą. Propozycje metodologiczne zaproponowane przez Kandydatkę wpisują się również w próbę rozwiązania problemu zadowalającej czułości takich analiz.

Analiza publikacji H1-6. W publikacjach H1 i H2 Kandydatka analizowała możliwość współoznaczania i zależności pomiędzy wybranymi biomarkerami/aminami biogennymi i ich metabolitami (DA, A, NA, 5-HT, L-DOPA, L-Tyr i L-Tryp) w próbkach pacjentów z guzami NET lub po przebytym udarze krwotocznym mózgu. Stosowała w tym celu różne techniki prekoncentracji *off line* (LLE, LPME, SPE, DLLME). Etap ten okazał się na tyle skuteczny (po zoptymalizowaniu warunków dla stabilności analitów), że Kandydatka z sukcesem zastosowała metodę MEKC-DAD-CE do oznaczania wybranych analitów w próbkach moczu pacjentów. Metoda ta nie wymaga często problematycznego znakowania np. fluoresceiną amin, przez co jest szybsza, mniej kosztowna niż często stosowana metoda CE-LIF. Kandydatka zastosowała (H1) zaawansowane techniki statystyczne (HCA) do określenia współzależności pomiędzy badanymi analitami w zastosowanych technikach prekoncentracyjnych. Efektywność

prekoncentracji analitów w zastosowanych przez Kandydatkę warunkach okazał się wystarczający, aby zastosować mniej czułą technikę jaką jest MEKC-DAD-CE zamiast wysokoczułej, ale też „wysokokosztowej” techniki CE-LIF (bądź jeszcze kosztowniejszej CE-MS).

W pracach H3 i H4 Kandydatka wykorzystała metodę mikroekstrakcji i prekoncentracji SPME i dodatki cieczy jonowych (IL) jako środków desorbujących anality/aminy biogenne (DA, A, NA, L-Tyr i L-Trp) z matrycy złoża. Podejście takie wpisuje się w nurt tzw. „zielonej chemii”, chociaż niewielu autorów prac w których stosowane są rozpuszczalniki typu IL podaje, co się z nimi dzieje po wykorzystaniu w procesie ekstrakcji. Kandydatka optymalizowała proces wyodrębniania wybranych biomarkerów z próbek moczu pacjentów testując różne złoża SPME i typy IL. Pozwoliło to wyciągnąć wnioski nt. zależności pomiędzy właściwościami tych związków i badanymi analitami. Wstępne przygotowanie próbki ponownie pozwoliło wykorzystać metodę MEKC-DA-CE do analizy biomarkerów. Optymalizacja przygotowania próbki i jej następczej analizy okazała się na tyle efektywna, że Kandydatka wystąpiła do UP RP o opatentowanie tej metody, który to wniosek został zaakceptowany.

Praca H4 jest rozwinięciem koncepcji zawartej w pracy H3. Wykorzystując metodologię IL-SPME-MEKC-DAD-CE Kandydatka postanowiła oznaczyć profil biomarkerów (DA, A, NA, L-Tyr i L-Trp, 5-HT, VMA, HVA) z tkanki mózgowej szczura. Tkanka mózgowa okazała się nastrożać Kandydatce znacznie większe kłopoty w trakcie wyodrębniania biomarkerów, niż wcześniej badane próbki moczu. Optymalizacja procedur wstępnego przygotowania próbki, a następnie jej analizy elektroforetycznej pozwoliła Kandydatce na scharakteryzowanie wybranego profilu biomarkerów tkanki mózgowej.

Wykorzystując wyniki przedstawione w pracach H1-H4 Kandydatka postanowiła oznaczyć biomarkery (DHPG, MHPG, VMA, HVA, NM, M, DOPAC) jako substancje wskaźnikowe guzów NBL i chromochłonnego nadnerczy. Szeroka analiza złoży SPE i SPME połączona z analizą eluentów i desorbentów pozwoliła zoptymalizować proces izolacji wybranych biomarkerów i zastosować metodę MEKC-DAD-CE do ich analizy. W pracy również kandydatka użyła analizy HCA do znalezienia zależności pomiędzy właściwościami biomarkerów i warunkami procesów wstępnego przygotowania próbki do analizy. We wszystkich pracach H1-H5 Kandydatka zastosowała również procedurę wzbogacania próbki *on line*, w trakcie analizy przygotowując w odpowiedni sposób próbkę względem buforu separacyjnego. Połączenie metod izolacji biomarkerów, a następnie ich zateżania *off* i *on line* pozwoliło kandydatce na ich oznaczenie metodą CE z wykorzystaniem spektrofotometrycznego detektora DAD, a unikając wysokoczułych, lecz kosztownych metod CE-LIF lub CE-MS.

Ostatnia praca „cyklu habilitacyjnego” H6, jest pracą przeglądową, w której Kandydatka jest współautorką. Pokazuje ona współczesny stan wiedzy nt. metod wykorzystywanych w analizach elektroforetycznych mających na celu zateżenie próbki i podniesienie czułości analizy. Problematyka jest próbą rozwiązania jednego z największych ograniczeń jakim jest analiza związków biologicznie czynnych w biomatrycach z wykorzystaniem detektora spektrofotometrycznego.

Praca H6 ta pokazuje dobrą orientację Kandydata w aktualnym stanie technologii związanych z przygotowywaniem/prekoncentracją próbek w analizach CE. Poza stosowanymi już w analizach CE metodami prekoncentracyjnymi, Kandydatka zawarła też w tej publikacji opis tak nowych i odmiennych od dotychczas stosowanych metod, jak SDME. Umiejętność napisania pracy przeglądowej, że Kandydatka ma umiejętność do szerokiego spojrzenia na wybrane aspekty elektroforetycznej analizy biomarkerów.

Podsumowując analizę publikacji H1-6, mogę stwierdzić, że Kandydatka jest specjalistką w zakresie analizy biomolekuł i przy pomocy technik elektromigracyjnych, potrafiącą samodzielnie określić problem badawczy i znaleźć drogę do jego rozwiązania.

Ocena dorobku naukowego Kandydatki nie wchodzącego w skład osiągnięcia habilitacyjnego

Bardzo dobrze oceniam również publikacyjny dorobek naukowy Kandydatki w postaci 12-tu publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego (II.II. 2.1.). Większość tych prac pochodzi z dobrych czasopism naukowych. Są one tematycznie powiązane z szeroko rozumianą bioanalityką. Wszystkie prace są wieloautorskie, w 5-ciu z nich Kandydatka jest pierwszym autorem (w jednej autorem korespondencyjnym). We wniosku Kandydatka prezentuje również dorobek naukowy uzyskany przed uzyskaniem stopnia doktora n. farm (II.I 1,2). Jest on znaczący i wartościowy (7 publikacji, w tym jedna monografia). Dorobku tego nie oceniałem w kontekście osiągnięcia habilitacyjnego. Pokazuje on jednak ciągły rozwój naukowy Kandydatki.

Ocena działalności naukowej Kandydatki

Istotnym aspektem pracy naukowej jest umiejętność zdobywania funduszy na badania. W trakcie swojej kariery naukowej Kandydatka wykazała się skutecznością w tym zakresie. Kandydatka była kierownikiem grantów NCN Miniatura, grantu dla młodych naukowców ze środków MNiSW/GuMed, grant Fundacji GetResponse Cares oraz współwykonawcą grantu NCBiR. Pokazuje to umiejętność Kandydatki zdobywania środków i samodzielnego lub we współpracy z innymi badaczami prowadzenia projektów naukowych. Kandydatka odbyła dużą liczbę krajowych i zagranicznych krótko-(5) i długoterminowych (2, półroczny i roczny) staży/praktyk naukowych. Pokazuje to samodzielność naukową Kandydatki i umiejętność prowadzenia badań naukowych w innych niż macierzyste laboratoriach. Kandydatka bierze aktywny udział w prezentacji uzyskanych przez siebie wyników o czym świadczą wygłoszone przez nią referaty na konferencjach naukowych (2 w j. polskim 1 w j. angielskim) 4 międzynarodowych) i 25 doniesień prezentowanych w postaci posterów (jako główny autor lub współautor). Kandydatka również współorganizowała i była członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji naukowej CECE 2019 (Gdańsk). Jest także recenzentem prac naukowych w prestiżowych czasopismach naukowych (12 czasopism naukowych II.II 2.2 10 (w tym Electrophoresis, MDPI Molecules, ACS Omega). Liczba zrecenzowanych prac-19. Kandydatka jest członkiem 6 krajowych i międzynarodowych towarzystw naukowych oraz dwóch komitetów redakcyjnych czasopism z listy JCR. Jest również zaangażowana we wspólne badania zarówno z podmiotami krajowymi, jak i zagranicznymi (Niemcy, Korea). Wykazuje się też umiejętnością w zakresie chronienia prawa własności uzyskanych przez siebie wyników badań (Patent UP RP P422788)

Ocena aktywności dydaktycznej i organizacyjnej Kandydatki

Kandydatka może również wykazać się również aktywnością dydaktyczną, aczkolwiek opis tego aspektu aktywności budzi pewien niedosyt. Kandydatka była członkiem komisji RW Farmaceutycznego z OMŁ ds. Planów i Programów Studiów Doktoranckich, koordynowała pracę studentów zaangażowanych w



UNIWERSYTET GDAŃSKI



prace pomocnicze przy konferencji CECE 2019, recenzuje prace studentów kwalifikując ich do udziału w konferencji „Młodzi Naukowcy”, a także recenzuje ich teksty pokonferencyjne. Nie ma natomiast informacji o zajęciach dydaktycznych i opiece nad pracami dyplomowymi studentów.

Podsumowanie

Oceniając dorobek naukowy uzyskany po otrzymaniu stopnia doktora n. farmaceutycznych, na podstawie uzyskanych wartościowych i nowatorskich wyników badań nad prekoncentracją *off* i *on line* biomarkerów (głównie amin biogennych i ich metabolitów) charakteryzujących wybrane, istotne z punktu widzenia ochrony zdrowia człowieka stany patogenne powiązanych z zastosowaniem technik elektromigracyjnych (CE) oraz całokształtu dotychczasowej aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej dr Natalii Miękus-Purwin stwierdzam, że zaprezentowane przez nią w ramach osiągnięcia habilitacyjnego wyniki badań wnoszą istotne elementy nowości do współczesnego stanu wiedzy z zakresu bioanalitiky i pokazują istotny wkład Kandydatki w rozwój technik zateżania bioanalitów obecnych w złożonych matrycach biologicznych oraz w metodologię technik elektromigracyjnych związanych z ich oznaczaniem. Analiza przedstawionego mi dorobku Kandydatki pozwala stwierdzić jej dużą samodzielność naukową we wszystkich aspektach jej działalności oraz umiejętność rozwiązywania postawionych przed nią problemów badawczych.

Stwierdzam, że dr Natalia Miękus-Purwin spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o jej dopuszczenie do dalszych etapów postępowania habilitacyjnego.


Piotr Mucha

