

Kraków, 8.01.2021 r.



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

OCENA

dorobku naukowego oraz rozprawy habilitacyjnej
dr nauk farmaceutycznych Natalii Miękus-Purwin
adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej
Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Pani dr n. farm. Natalia Miękus-Purwin ukończyła studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku (dziś Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego). Tytuł magistra farmacji uzyskała na podstawie pracy pt.: „Generation of antibodies specific for the phosphorylated form of indoleamine 2,3-dioxygenase, a master regulator of the immune system” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Nasala podczas pobytu w Zakładzie Medycyny Eksperymentalnej i Biochemii Uniwersytetu w Perugii w ramach programu wymiany studentów Socrates/Erasmus. W roku 2015 uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych nadany przez Radę Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Optymalizacja metod bioanalitycznych podczas oceny potencjalnych biomarkerów nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego”, której promotorem był prof. dr hab. Tomasz Bączek. W roku 2012 uzyskała prawo wykonywania zawodu farmaceuty, a od listopada 2015 r. podjęła pracę na Uniwersytecie Gdańskim na Wydziale Biologii w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka, początkowo na stanowisku specjalisty, a od roku 2016 na stanowisku adiunkta.

Analiza prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora wskazuje, że Habilitantka od początku kariery naukowej interesowała się analizą leków i substancji endogennych z wykorzystaniem metod HPLC oraz elektroforezy kapilarnej, a także fosfoproteomiką. Do roku 2015 opublikowała 6 prac z tego zakresu. Okres przed doktoratem obfitował także w liczne staże zagraniczne, które odbyła m.in. w Wielkiej Brytanii, Włoszech, Niemczech i Hiszpanii, podczas których Habilitantka zapoznała się z technikami tj. LC-

Wydział Farmaceutyczny

Zakład Farmakokinetyki
i Farmacji Fizycznej

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48 12 620 57 20

fax +48 12 620 57 30

MS i MALDI-MS i ich zastosowaniem w proteomice. W ramach pracy doktorskiej Kandydatka zoptymalizowała metodę MEKC-DAD umożliwiającą rozdzielanie 10 analitów ze szlaku metabolicznego L-tryptofanu i L-tyrozyny, a następnie metoda ta została zastosowana do analizy dwóch metabolitów katecholamin: kwasu homowanilinowego (HVA) i kwasu wanilinomigdałowego (VMA) u pacjentów pediatrycznych z nowotworami neuroendokrynnymi (NET). W Autoreferacie Habilitantka podaje, że uzyskane wyniki stężeń badanych związków wykazały spójność z danymi literaturowymi, jednak nie wskazuje żadnego źródła takich danych.

Od stycznia 2016 roku, dr Natalia Miękus-Purwin podjęła pracę w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej na stanowisku adiunkta (początkowo w niepełnym wymiarze godzin), na którym pracuje do chwili obecnej. Od samego początku zatrudnienia w GUMed, dr Miękus-Purwin zajmowała się rozwojem i walidacją metod oznaczania amin biogennych i ich metabolitów przy użyciu micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MEKC) i detektora z matrycą diodową (DAD) oraz różnych technik ekstrakcji. Wynikiem tych badań są liczne prace opublikowane w impaktowanych czasopismach oraz kilka innych prac, dotyczących analizy stężeń leków metodami HPLC z różnymi typami detekcji oraz karotenoidów w surowcach roślinnych. Badania te realizowała zarówno ze środków uczelnianych, jak i zewnętrznych, w tym z grantu NCN Miniatura oraz międzynarodowego grantu NCBiR, realizowanego przy współpracy z jednostkami naukowymi z Korei Południowej, Węgier, Czech i Słowacji, którego jest współwykonawcą, a także grantu finansowanego przez Fundację GetResponse Cares. Dr Miękus-Purwin prezentowała swoje wyniki także na wielu konferencjach krajowych i zagranicznych. W roku 2019 odbyła krótki staż podoktorski w Katedrze Chemii na Uniwersytecie w Seulu w Korei Południowej, gdzie zajmowała się ekstrakcją niesteroidowych leków przeciwzapalnych z próbek biologicznych. Habilitantka wykazywała się też działalnością organizacyjną, m.in. była współorganizatorem i członkiem komitetu organizacyjnego 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. Jest członkiem kilku organizacji zawodowych oraz towarzystw naukowych, np. Gdańskiej Okręgowej Izby Aptekarskiej, Gdańskiej Okręgowej Komisji Rewizyjnej, Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, czy Cancer Epigenetics Society. Ponadto

jest członkiem komisji opiniodawczej dwóch czasopism oraz recenzowała prace w 12 czasopismach naukowych. Od roku 2017 dr Miękus-Purwin współpracuje z ośrodkiem w Niemczech w zakresie technik izolacji związków biologicznie czynnych z próbek biologicznych. Wynikiem tej współpracy jest publikacja w czasopiśmie Electrophoresis. W tym samym roku rozpoczęła także współpracę z Zakładem Technologii Owoców i Warzyw, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego. Habilitantka jest też współautorem udzielonego krajowego patentu pt.: „Sposób izolacji amin biogennych w moczu”.

Dorobek naukowy dr Natalii Miękus-Purwin przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje 6 prac pełnotekstowych o łącznym IF równym 8,430 (118 punktów MNiSW), a po uzyskaniu stopnia doktora 13 prac z IF = 35,503 (803 punktów MNiSW). W 9 pracach była pierwszym autorem, w jednej tylko autorem korespondencyjnym. Sumaryczny impact factor opublikowanych prac wynosi 69,567, całkowita liczba cytowań wg WoS to 99, a indeks Hirscha wynosi 6. Osiągnięcia naukowe Habilitantki zostały docenione i w roku 2017 oraz 2019 otrzymała nagrodę Dziekana Wydziału Biologii za osiągnięcia naukowe oraz nagrody zespołowe: 1. stopnia dla pracowników GUMed za „Rozwój nowoczesnych metod w analizie biomedycznej i farmaceutycznej” oraz nagrodę Rektora GUMed II stopnia za „Opracowanie metod zmierzających do analizy neurotransmiterów i substancji leczniczych za pomocą technik elektromigracyjnych”.

Ocena osiągnięcia naukowego

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe, pt.: „Nowe podejścia analityczne do oznaczania wybranych amin biogennych w próbkach biologicznych jako biomarkerów wytypowanych jednostek chorobowych” stanowi część 6 prac zbiorowych, w tym 1 pracy pogładowej, które ukazały się w czasopismach impaktowanych o łącznym IF=25,634 (360 punktów MNiSW) w latach 2016-2020. W 5 pracach dr Miękus-Purwin jest pierwszym autorem, ale tylko w dwóch autorem korespondencyjnym. Wkład merytoryczny w powstanie tych prac dotyczył najczęściej opracowania hipotezy i koncepcji badawczej, współpracy z lekarzami podczas pobierania materiału do badań, przeprowadzenia analiz oraz opracowania manuskryptu, a także udziału

w pisaniu pracy i odpowiedzi na recenzje. Pomimo tego, że wymienione aktywności stanowią większą część prac związanych z wykonaniem badań i przygotowaniem manuskryptów, udział procentowy Habilitantki waha się w szerokim zakresie od 30 do 80%, z przewagą udziałów na poziomie <50 % (4 prace). Spośród 10 pozostałych współautorów pracy poglądowej H6, oświadczenie podpisał tylko jeden z nich. Tematyka tych prac oscyluje wokół optymalizacji procedur ekstrakcyjnych amin biogennych i ich metabolitów z wykorzystaniem techniki MEKC-DAD. We wstępie Autoreferatu Habilitantka przedstawia metody opisane w literaturze, pozwalające na oznaczenie amin biogennych i ich metabolitów w materiale biologicznym oraz technik ich ekstrakcji. Jak wynika z przedstawionych danych, istnieje wiele metod, które wykorzystują izolację tych związków z materiału biologicznego przy użyciu ekstrakcji do fazy ciekłej (LLE) oraz stałej (SPE), dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz (DLLME), czy mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME). Najczęściej stosowane do oznaczania tych związków techniki analityczne to HPLC z różnymi typami detekcji, w tym elektrochemiczną i tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Nie wspomniano w Autoreferacie o szybkich i bardzo czułych metodach immunoenzymatycznych oraz systemie Luminex. Przedstawione metody analityczne pozwalają na oznaczenie badanych związków w materiale biologicznym różnego pochodzenia (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, homogenaty tkanek, mocz) i charakteryzują się czułością na poziomie nanogramów, a nawet pikogramów na mililitr. W związku z tym, celowość podjęcia przez Habilitantkę badań polegających na optymalizacji strategii analitycznych związanych z ekstrakcją i prekoncentracją amin biogennych przed ich analizą elektroforetyczną nie wydaje się w pełni uzasadniona.

Praca H1 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego dotyczy walidacji opracowanej wcześniej metody oznaczania 7 amin biogennych w moczu przy użyciu metody DLLME/MEKC/DAD zgodnie z wymogami FDA and ICH. Jako źródło literaturowe tych wytycznych podano pracę poglądową z roku 2007, a nie odpowiednie nowsze przewodniki dotyczące walidacji metod bioanalitycznych. W ramach realizowanych prac testowano różne metody ekstrakcji badanych związków z próbek moczu, tj. LLE, SPE i DLLME. Walidacja metody nie została jednak przeprowadzona zgodnie z wytycznymi FDA: brak badań stabilności, niektóre krzywe kalibracji składają się z mniej

niż sześciu punktów, a precyzja i dokładność metody została oszacowana w oparciu o trzy, a nie, jak wskazują wytyczne FDA, cztery stężenia QC (LLOQ, L, M i H). Opisana procedura wybranej ostatecznie metody ekstrakcji nie jest identyczna ze znaną z literatury metodą DLLME. Zastosowano stosunkową dużą, w odniesieniu do objętości moczu (1 ml), objętość odczynnika ekstrahującego (0.5 ml), podczas gdy w cytowanych przez Habilitantkę pracach, do próbki badanej szybko wstrzykiwano mieszaninę cieczy dyspergującej i niewielkiej objętości odczynnika ekstrahującego. Nie wyjaśniono jaką rolę w tej metodzie pełni etanol. Nie podjęto prac zmierzających do określenia najkorzystniejszej objętości dichlorometanu w tej metodzie. Próbkę moczu pobrane od badanych dzieci zostały mocno zakwaszone (do pH = 2), natomiast w opisie metody ekstrakcji nie ma wzmianki o alkalizacji próbek przed dodaniem odczynnika ekstrahującego, celem cofnięcia dysocjacji badanych amin. Nie wyjaśniono także w dyskusji wyników, dlaczego nie powiodła się próba hydrolizy glukuronidów badanych związków (Ryc. 4). Opracowaną metodę analityczną zastosowano do oznaczenia stężeń amin biogennych w moczu dzieci zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną oraz pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowanym guzem neuroendokrynnym. Wyniki tych badań również generują wiele pytań. Przede wszystkim nie jest jasne, dlaczego prowadząc 24-godziną zbiórkę moczu, wyniki przedstawiono w jednostkach stężenia ($\mu\text{g/ml}$). Zakresy referencyjne amin katecholowych dostępne w literaturze wyrażone są zazwyczaj w $\mu\text{g}/24\text{ h}$ albo na mmol kreatyniny. Aby porównać wyniki pomiędzy grupą badaną i kontrolną w obliczeniach należałoby uwzględnić objętość zebranego moczu. Próba obliczenia ilości amin biogennych wydalonych w ciągu doby z uwzględnieniem średniej objętości moczu wydalanej przez dzieci (1 ml/kg/h) i wartości podanych w Tabeli 3 prowadzi do uzyskania wartości znacznie przekraczających wartości referencyjne. Ponadto wg danych literaturowych, zakresy ilości wydalanej w ciągu 24 h dopaminy są większe niż wydalanej noradrenaliny, podczas gdy wartości w Tabeli 3 wskazują na odwrotną zależność pomiędzy tymi wartościami. Autorzy pracy nie skomentowali tego faktu. Co więcej, w wielu przypadkach u osobników zdrowych odchylenia standardowe są większe od wartości średnich (Tab. 3), co utrudnia wykazanie różnic statystycznych pomiędzy grupami, a co za tym idzie, wykazanie przydatności badanych biomarkerów w diagnostyce NET. Nie wyjaśniono też,

w jaki sposób pozyskano mocz bez amin biogennych. Wyciągnięte w tej pracy wnioski nie znajdują potwierdzenia w uzyskanych wynikach, na podstawie których, z przyczyn opisanych powyżej, nie można stwierdzić, że zaproponowany poszerzony panel biomarkerów może być wykorzystywany w diagnostyce zwojaka zarodkowego (NBL). Istotną wadą opracowanej metody analitycznej jest jej niewielka czułość. LOQ na poziomie 500 ng/ml nie pozwoli na oznaczenie stężeń badanych związków w większości płynów ustrojowych. W projekcie Miniatura do oznaczania neuroprzekaźników Habilitantka stosowała detektor z laserowo wzbudzoną fluorescencją. Powstaje pytanie, dlaczego czulszy detektor nie został użyty w badaniach stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego w przypadkach, gdzie nie udało się zmierzyć stężeń niektórych badanych związków (Tab. 3 w H1)? Z kolei, praca H2 ukazuje próbę wykorzystania opracowanej wcześniej metody do oznaczenia stężeń amin biogennych w moczu pacjentów po udarze niedokrwiennym. W pracy tej planowano przetestowanie 11 potencjalnych biomarkerów, stosując ekstrakcję ciecz-ciecz dla kwaśnych metabolitów oraz metodę DLLME dla pozostałych związków. Tymczasem wyniki badań przedstawione w Tab. 2 i na Ryc. 1 dotyczą zaledwie 5 biomarkerów. Co więcej, wartości stężeń tych biomarkerów (choć zblizone do tych z pracy H1) tym razem wyrażone są w ng/ml, a dla zdrowych osobników przy wartościach średnich stężeń nie podano odchyień standardowych. Stąd też, tutaj także wiarygodne porównanie obydwu grup nie jest możliwe. Na Ryc. 1 nie opisano osi oraz nie zaznaczono piku standardu wewnętrznego. W tej pracy mała czułość metody także nie pozwoliła na oznaczenie stężeń analitów u wszystkich pacjentów. Omawiając przyczyny różnic w stężeniach występujące w Tab. 2, powiązano je ze stosowanymi lekami, jednak nie wyjaśniono mechanizmów obserwowanych zmian. Praca H3 dotyczy porównania 3 metod (tj. SPE, SPME z użyciem cieczy jonowej i DLLME) ekstrakcji neuroprzekaźników w próbkach mózgu szczura. W celu pracy planowano oznaczenie 9 neuroprzekaźników, jednak w dalszej jej części, np. w Tab. 1, czy na Ryc. 2 nie pojawia się jeden z nich (L-DOPA). Żadna z proponowanych procedur ekstrakcji nie pozwoliła na oznaczenie wszystkich badanych związków równocześnie oraz na oznaczenie endogennych stężeń badanych związków w mózgu szczura (Ryc. 3 i 4). Bez mierzalnych stężeń w grupie kontrolnej, nowa metoda nie znajdzie zastosowania w badaniach z użyciem modeli zwierzęcych chorób

neurodegeneracyjnych. Jak wynika z danych literaturowych, stężenia amin biogennych w mózgu szczura są na poziomie: 0.27, 0.45, i 4.27 $\mu\text{g/g}$ odpowiednio dla noradrenaliny, serotoniny i dopaminy (J. Chrom. B, 2004, 807, 177-83), a więc znacznie poniżej stężeń tych analitów użytych do testowania procedur ekstrakcji (10 $\mu\text{g/g}$). Kolejna praca (H4) wchodząca w skład osiągnięcia dotyczy badań nad metodą ekstrakcji z wykorzystaniem SPME i cieczy jonowej jako dodatku do desorbentu do oznaczeń 5 amin biogennych rozpuszczonych w sztucznym moczu. Niestety w pracy nie podano składu, ani pochodzenia tej matrycy. Badania prowadzono w przy różnych wartościach pH moczu, z wykorzystaniem różnych cieczy jonowych oraz przy wzrastających stężeniach, wybranej do dalszych badań, cieczy jonowej dodanej do metanolu jako desorbenta. Szkoda, że w ramach tych badań nie zwalidowano opracowanej metody analitycznej oraz nie potwierdzono jej przydatności w odniesieniu do rzeczywistych próbek moczu. Ostatnia z serii prac eksperymentalnych, praca H5, powieliła w znacznym stopniu opisane wcześniej metody ekstrakcyjne, ale poszerza nieco wachlarz analitów o metabolity amin biogennych, tj. DHPG, MHPG, DOPAC oraz metanefryn NM i M. Te ostatnie dwie cząsteczki uważane są lepsze markery diagnostyczne NBL czy guza chromochłonnego nadnerczy w stosunku do katecholamin czy ich kwaśnych metabolitów, zwłaszcza gdy mierzone są w osoczu chorych. W pracy H5 przetestowano 25 różnych procedur ekstrakcji badanych związków z moczu opierających się na DLLME, SPE oraz SPME. W metodyce badań nie podano źródła, z jakiego pochodził mocz do badań. Jak wykazała analiza chemometryczna, C18-SPE z wykorzystaniem metanolu jako eluentu jest najlepszą z testowanych metod do oznaczenia DHPG, HVA, DOPAC i NM, natomiast SPME-PS-DVB przy użyciu tego samego rozpuszczalnika do desorpcji okazała się najbardziej efektywna dla MHPG i M. Co ciekawe, dodatek cieczy jonowej zwiększył wydajność ekstrakcji jedynie dla metanefryny, zaś dla pozostałych badanych związków wywołał efekt odwrotny. Wyznaczone LOD opracowanych metod to 100 ng/ml dla wszystkich badanych związków. Porównując uzyskane wartości współczynnika wzbogacenia (maks. 7.8) z danymi literaturowymi, czy wynikami uzyskanymi w H4, można stwierdzić, że są one stosunkowo niewielkie. Niestety, nie przeprowadzono pełnej walidacji opracowanych metod analitycznych, co istotnie obniża potencjał aplikacyjny otrzymanych wyników badań. Ostatnia

z prac (H6) stanowiących osiągnięcie Habilitantki, to praca pogładowa, która obejmuje szeroki przegląd najnowszych technik zarówno in-line, jak i on-line stosowanych do izolacji, wzbogacania i separacji analitów w różnych matrycach biologicznych. Na uwagę zasługuje fakt, że praca ta napisana została w ramach współpracy międzynarodowej.

Biorąc pod uwagę dorobek naukowy, który został istotnie zwiększony po uzyskaniu stopnia doktora oraz posiadane doświadczenie dydaktyczne i działalność organizacyjną, należy uznać, że dr Natalia Miękus-Purwin jest dobrze zapowiadającym się pracownikiem naukowo-dydaktycznym, o dużym doświadczeniu w zakresie opracowywania i rozwoju metod bioanalitycznych. Wydzielone zagadnienie, stanowiące część prac zbiorowych, jest wyraźnie zaznaczonym, indywidualnym wkładem Kandydatki ubiegającej się o stopień doktora habilitowanego w powstanie tych prac. Niestety, liczne błędy i niejasności występujące w poszczególnych publikacjach, a przede wszystkim brak wiarygodnych wyników potwierdzających przydatność opracowanych metod w diagnostyce NET czy badaniach na zwierzętach, nie pozwalają na stwierdzenie, że Habilitantka posiada w swoim dorobku osiągnięcia naukowe stanowiące istotny wkład w rozwój nauk farmaceutycznych. W oparciu o przedstawione wyżej argumenty stwierdzam, że oceniane osiągnięcie naukowe nie spełnia kryteriów określonych w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.), a Kandydatka nie jest w pełni przygotowana do samodzielnej pracy naukowej. Dlatego też nie rekomenduję nadania dr Natalii Miękus-Purwin stopnia doktora habilitowanego.

Zakład Farmakokinetyki
i Farmacji i Higieny UJCM
Główny
prof. dr hab. inż. Andrzej Wójcik