



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego

„Analiza wybranych związków hydrofobowych przy użyciu technik elektromigracyjnych”

Rozprawa doktorska mgr farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego zatytułowana „Analiza wybranych związków hydrofobowych przy użyciu technik elektromigracyjnych” poświęcona jest problemowi wzbogacania analitu on-line w procesie separacji z użyciem elektroforezy kapilarnej (CE). CE jest nowoczesną (choć rozwijaną już od ponad 4 dekad) metodą analityczną pozwalającą na detekcję/analizę szerokiego spektrum związków, w tym tych o aktywności farmakologicznej poprzez ich ruch w polu elektrycznym o wysokim potencjale w cienkiej, zazwyczaj szklanej kapilarze. Jak poważnym problemem jest analiza czystości, oznaczenie stężenia w złożonych matrycach biologicznych, profilu farmakologicznego czy też wiązanie się leku z docelowym receptorem boleśnie nauczył nas niesławny przypadek talidomidu. W chwili obecnej dominującą pozycję w analizie farmaceutyków mają metody chromatograficzne, takie jak GC, a szczególnie HPLC. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest znacznie niższa, niż w wypadku wspomnianych metod chromatograficznych, czułość analizy. Głównym tego powodu jest niewielka droga optyczna (25-100 μm) jaką charakteryzuje się kapilara w metodzie CE. O ile nie jest to poważnym problemem w wypadku dużych stężeń z jakimi zwykle mamy do czynienia w wypadku materiału syntetycznego, o tyle oznaczenia analitów występujących w niskich lub ultra-niskich stężeniach w złożonych matrycach np. płynów fizjologicznych, tkanek czy komórek, stanowią już poważne wyzwanie. Mimo różnych ograniczeń w ostatnich latach CE zyskuje rekomendacje FDA, jako alternatywna wobec HPLC metoda analizy środków farmakologicznych czy toksyn. Problemem wzbogacenia analitu w trakcie separacji metodą CE zajął się w swojej rozprawie mgr farm. Michał Sergiusz Pieckowski. Jego dysertacja zatytułowana „Analiza wybranych związków hydrofobowych przy użyciu technik elektromigracyjnych” powstała w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, którego pracownikiem jest promotor rozprawy dr hab. Piotr Kowalski, prof. GUMed. Rozprawa powstała w oparciu o (a właściwie jej rdzeń stanowią) cztery publikacje naukowe z dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Ich tematem przewodnim jest problem wzbogacania (zwiększenia stężenia) analitu w procesie separacji z użyciem metody CE). Z tego punktu widzenia tematyka dysertacji i uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla rozwoju nowoczesnych technik analitycznych-CE.

Formalna ocena rozprawy. Dysertacja liczy 68 stron. Jest tzw. zszywką zawierającą 4 wybrane przez kandydata publikacje zawierające opublikowane wyniki jego badań. Ułatwia to pracę recenzentowi rozprawy, gdyż opublikowane wyniki badań przeszły już gęstą sieć recenzji w uznanych czasopismach analitycznych. Poza wykazem publikacji, praca zawiera również opis celu przeprowadzonych badań z uwzględnieniem elektroforetycznych metod wzbogacania analitu, osiągniętych wyników oraz płynących z nich wniosków. Do tekstu dysertacji dołączone są też kopie publikacji naukowych. W tekście znajdują się odwołania do 95 pozycji literaturowych, zarówno historycznych dla CE [1,2], jak i uwzględniających najnowsze osiągnięcia sprzed kilku lat.

Przechodząc do merytorycznej oceny pracy na wstępie chciałbym zaznaczyć, że Doktorant podjął się trudnego zadania jakim była optymalizacja warunków umożliwiających amplifikację stężenia składników analitu badanych próbek. Każdy, kto kiedykolwiek używał elektroforezy kapilarnej z pewnością doceni ogrom pracy i czasu jaką/jaki musiał włożyć w dopracowanie warunków analizy i zapewnienie stabilności napięcia używając heterogennych/ wielofazowych buforów separacyjnych lub matryc próbki. O skali problemu niech świadczy fakt, że nawet sposób wprowadzania próbki, a także jej matryca wpływają na efektywność rozdziału i czułość analizy. Tematyka wszystkich prac jest związana z opracowaniem nowych matryc próbek oraz metod pozwalających na poprawę limitów detekcji analitów o właściwościach hydrofobowych przy zastosowaniu metody CE. Celem doktoranta było rozwiązanie jednego z głównych problemów jakim charakteryzuje się CE w porównaniu do metod chromatograficznych takich jak HPLC, jakim jest umiarkowana czułość analizy. Problem ten udało się Doktorantowi rozwiązać dla wybranych mieszanin analitów. W tym miejscu nasuwa mi się pytanie do Doktoranta, na ile zaproponowane metody wzbogacania analitów w metodzie CE są uniwersalne, czyli czy można je wykorzystać dla dowolnych hydrofobowych analitów? Mam też prośbę aby Kandydat przedstawił na otwartej części dysertacji metodologię oznaczania parametrów LOD i LOQ w metodzie CE, które wykorzystywał do charakterystyki ilościowej zwiększania czułości analizy. Za jedno z najciekawszych osiągnięć Doktoranta uważam wyniki uzyskane poprzez zastosowanie mikro/nanoemulsji do wzbogacania analitu (publikacja D4). Jak wygląda trwałość/zmienność takich układów w czasie i jak wygląda kwestia stabilności natężenia prądu w trakcie analizy z wykorzystaniem tej metody? Poprosiłbym o zaprezentowanie elektroferogramu zawierającego zarówno odpowiedź detektora, jak i krzywą natężania prądu.

Metodologiczne aspekty amplifikacji stężenia składników analitu z zastosowaniem metody CE stosowane przez Doktoranta zostały już zweryfikowane (poddane recenzjom) przez recenzentów uznanych czasopism (IF od 3.54; 4,6; 5,98; 6,06) o charakterze analitycznym (*Electrophoresis, Journal of Chromatography A, Analytica Chimica Acta, Talanta*-publikacje oznaczone jako D1-D4). Ułatwiło to pracę recenzenta niniejszej dysertacji. Ważność tematyki podjętej przez Doktoranta pokazuje liczba cytowań- 30 prac D1-D4. Jest to liczba znacząca biorąc pod uwagę, że zostały one opublikowane w ciągu kilku ostatnich lat. Ich znaczenie naukowe potwierdza też indeks Hirscha-3. Pomimo wcześniejszych recenzji w czasopismach i opublikowania swoich wyników we wspomnianych czasopismach mam jednak kilka uwag/pytań do Doktoranta dotyczących opisu przeprowadzonych badań-sekcja 2.3. (Omówienie wyników badań). Praca napisana jest poprawnym językiem, choć dotyczy skomplikowanego zagadnienia, jakim jest problem amplifikacji stężenia analitu w procesie elektroforetycznym. Dla czytelnika, który nie jest praktykującym użytkownikiem elektroforezy kapilarnej z pewnością wyda się „trudna” w odbiorze. Niestety taka jest natura problemów z którymi zmagał się doktorant w trakcie swoich badań. W tym duchu uważam, że niezwykle pożyteczną rzeczą byłaby lista skrótów (której brak), którymi posługiwał się Doktorant w swojej pracy. W kilku miejscach (np. podpis pod ryc. 1-tutaj nie ma też podanych jednostek długości i szerokości) Doktorant podaje tylko jeden parametr opisujący długość stosowanej kapilary. Zwykle podawane są dwa: tzw. długość całkowita i długość do detektora. Poproszę o komentarz. Również w tym miejscu (a także w kilku innych np. str 18) w opisie BGE brak jest wartości pH, jednego z kluczowych parametrów buforu. Jaki wpływ ma wartość pH (BGE) na ruchliwość elektroforetyczną analitu? W opisie do ryc. 1 Doktorant pisze, że udało się

uzyskać całkowitą separację (co jest prawdą) i symetryczne piki. Piki dla analitów nr 4, a zwłaszcza nr 6 nie są symetryczne. Mam też uwagi do opisu oddziaływań parabenów z cyklodekstrynami (str. 18). Parabeny będące estrami kwasu p-hydroksybenzoesowego nie mogą być zjonizowane, bo estry nie ulegają temu procesowi. Ulegają natomiast hydrolizie i produkty ich hydrolizy (kwas p-hydroksybenzoesowy) jak najbardziej mogą ulegać jonizacji. W pracy znalazłem też trochę niepoprawnych lub żargonowych zwrotów: wiązania hydrofobowe (str.16,18), ostre i wysokie piki (str. 16,18,21), wysoki sygnał (str. 17). Liczba defektów typograficznych jest znikoma. Grafika na wysokim poziomie.

Na podstawie oceny niniejszej dysertacji mogę stwierdzić, że mgr farm. Michał Sergiusz Pieckowski posiada już bogate doświadczenie w stosowaniu technik elektromigracyjnych opartych na metodzie CE w analizie związków biologicznie czynnych/farmakologicznie aktywnych. Najlepszym tego potwierdzeniem są 4 opublikowane w renomowanych czasopismach publikacje będące rdzeniem dysertacji. Fakt ten uważam za daleko wykraczający w stosunku do wymagań stawianych doktorantowi w ramach przewodu doktorskiego. W 3 z nich Doktorant jest pierwszym autorem, co pokazuje jego dominujący wkład w te badania. W tym miejscu chciałbym zgłosić małe zastrzeżenie odnośnie prezentacji wkładu Doktoranta w prezentowane badania. Ponieważ podstawą dysertacji są 4 publikacje wieloautorskie, w trakcie recenzji zawsze pojawia się kwestia wkładu autorów w badania. W przypadku publikacji D4 jest to wyraźnie pokazane (bo taka jest polityka czasopisma). W wypadku publikacji D2-D3 pozycja pierwszego autora (Doktoranta) zwyczajowo jest równoznaczna z wkładem dominującym. Natomiast w publikacji D1, gdzie autor „jest gdzieś w środku” listy nazwisk, trudno stwierdzić jaki miał wkład w badania. Moja sugestia jest taka, aby w przyszłości tą kwestię potraktować tak, jak w publikacji D4 i wtedy kwestia rozważania wkładu merytorycznego w badania będzie bezprzedmiotowa. Ten komentarz nie umniejsza mojej pozytywnej oceny umiejętności naukowych i wkładu Doktoranta w prezentowane badania. Sugeruje tylko jak w przyszłości uniknąć takich rozważań. Dokonania naukowe Doktoranta potwierdzają także udział w 7 konferencjach/zjazdach naukowych. Jego osiągnięcia zostały też docenione poprzez przyznanie mu stypendium POWR. Reasumując, mgr farm. Michał Sergiusz Pieckowski kandydat postawił przed sobą ambitne cele badawcze i skutecznie je zrealizował. Wykazał się przy tym dużą wiedzą związaną z wykorzystaniem technik elektroforetycznych opartych o elektroforezę kapilarną do analizy związków biologicznie aktywnych (głównie o aktywności farmakologicznej), które umożliwiły mu realizację tych celów. Są to z całą pewnością cechy dobrego naukowca. Z pełnym, przekonaniem stwierdzam, że recenzowana przeze mnie dysertacja zawiera istotne elementy nowości naukowej, spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych GUMed o dopuszczenie mgr farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę istotny wkład w rozwój w rozwój metod detekcji związków o aktywności farmakologicznej przy pomocy technik elektroforetycznych, istotność wyników uzyskanych przez mgr farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego, fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej oraz całego dorobku naukowego i wymogów regulaminowych, zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych GUMed o wyróżnienie dysertacji mgr farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego.

