



Warszawa, 19.07.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kaczmarczyk, Doktorantki

z

Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Ocenę opracowano na podstawie materiałów dostarczonych z Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wraz z pismem Pana prof. dr hab. Wiesława Sawickiego Przewodniczącego Rady (Uchwała Rady Nauk Farmaceutycznych GUMed nr 21/2023 z dnia 23 maja 2023 r.).

Materiały przygotowano zgodnie z art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dn. 20 lipca 2018 r. oraz § 12 ust. 2 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 30 stycznia 2018 r. poz. 261).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. n. farm. Ilony Olędzkiej z Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Kaczmarczyk dotyczy „Zastosowania cieczy jonowych do ekstrakcji i rozdzielania metodą MEKC amin biogennych”. W skład rozprawy doktorskiej zaliczono **pięć oryginalnych publikacji naukowych**. Każda z pięciu publikacji, z okresu 2018 – 2023, w których Pani mgr Natalia Kaczmarczyk jest współautorką została opublikowana w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (IF=22,784; MEiN 360). Doktorantka w trzech z nich była pierwszym autorem, dla publikacji P2, P4 i P5. Doktorantka określiła swój udział w pracach wieloautorskich opisowo i procentowo, wskazując na istotną rolę w badaniach i opracowaniu manuskryptów. Wkład merytoryczny w powstanie publikacji określono w zakresie przeprowadzenia analiz separacyjnych, ekstrakcji analitów z matrycy, zbierania surowych danych eksperymentalnych, udziału w redagowaniu manuskryptu, odpowiedzi na recenzję. W przypadku ustalonej kolejności autorstwa wskazującego Doktorantkę, jako pierwszego autora, poza wkładem określonym powyżej, wskazano również udział w opracowaniu koncepcji badawczej i metodologii oraz udział w pisaniu manuskryptu.

W publikacjach P1 i P2 brak informacji o wkładzie poszczególnych autorów w proces tworzenia zamieszczonych na końcu publikacji. W P3 stosownie do deklaracji wkładu poszczególnych autorów zamieszczonym na końcu publikacji P3 Autorzy

zadeklarowali iż, w zakresie przeprowadzania eksperymentów w laboratorium oraz zbierania surowych danych eksperymentalnych funkcje te pełniły trzy współautorki, obok Doktorantki również Pani dr hab. Natalia Miękus oraz Pani Marta Rudnicka. W P4 stosownie do deklaracji wkładu poszczególnych autorów zamieszczonym na końcu publikacji P4 Autorzy zadeklarowali iż, Doktorantka była odpowiedzialna za przeprowadzenie procesu badawczego i dochodzeniowego, w szczególności przeprowadzanie eksperymentów oraz opracowanie metodologii. W P5 Doktorantka była odpowiedzialna za koncepcje pracy, metodologię, oprogramowanie, walidacje, analizę formalną, przeprowadzenie badań, zasoby, napisanie wstępnej wersji roboczej oraz przygotowania odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Stosownie do wymagań dokumentacyjnych wniosku w sprawie nadania stopnia doktora (Uchwała nr 90/2020 Senatu GUMed z dnia 21 grudnia 2020 roku w przedmiocie określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, rozdział 3, § 15), gdy rozprawa doktorska stanowi zbiór powiązanych tematycznie artykułów w przypadku prac wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez Kandydata oraz współautorów wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy. Stosownie do Rozdziału 7, § 29 Uchwały nr 90/2020 Senatu GUMed, Kandydat przedkłada promotorowi lub promotorom oświadczenia wszystkich jej współautorów określających indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie.

Oświadczenia współautorów określających swój udział w publikacjach zostały przesłane Recenzentce drogą elektroniczną w dniu 6 lipca 2023 roku.

Zgodnie z przedstawionymi oświadczeniami współautorów udział procentowy Kandydatki w przygotowaniu każdej z publikacji wynosił od 20% do 30%, przy czym liczba autorów poszczególnych prac wynosi od 7 do 11. W przypadku publikacji P2 i P3 jeden z Autorów nie złożył oświadczenia (co jest zgodne z Uchwałą nr 90/2020 Senatu GUMed z dnia 21 grudnia 2020 r.). Natomiast dla publikacji P3 po zsumowaniu wartości procentowych wskazanych w oświadczeniach współautorów przedstawiona wartość procentowa dla sześciu z siedmiu współautorów (6/7) osiągnęła maksymalny limit 100%. W publikacji P3 Kandydatka jest na czwartym miejscu (4/7) z szacowanym wkładem 25%, natomiast dla współautorki z trzeciego miejsca nie wskazano procentu zaangażowania w pracę i nie dostarczono oświadczenia. O kolejności wskazania autorów w publikacji powinna decydować wielkość wkładów twórczych w proces tworzenia, co powinno mieć swoje odzwierciedlenie we wskazanej wartości procentowej, natomiast w przypadku publikacji P1, P3 i P4 oznaczanie autorstwa jest inne niż założone przez Recenzentkę kryterium wkładu.

Pierwsza publikacja (P1) i czwarta (P4) w cyklu zostały opublikowane w *Talanta* (Kwartył Talanty to Q1; wydawnictwo Elsevier), druga publikacja w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Kwartył Q1; Elsevier), trzecia w *Journal of Chromatography A* (Chemia analityczna (Q1); Chemia organiczna (Q1); Biochemia (Q2), Medycyna (różne) (Q2); Elsevier), a piąta została opublikowana w czasopiśmie z otwartym dostępem (open access), *Separations* (Kwartył Q2; MDPI). Każda kategoria tematyczna czasopism podzielona jest na cztery kwartyle: Q1, Q2, Q3, Q4, gdzie Q1 zajmuje 25% najlepszych czasopism na liście; Q2 zajmują czasopisma z grupy od 25 do 50%.

O wysokiej wartości publikacyjnej Doktorantki, jako współautorki świadczą cztery publikacje opublikowane, po uprzednim otrzymaniu pozytywnych recenzji w prestiżowych, międzynarodowych czasopismach zaliczanych do kwartyłu Q1 i jednej do Q2.

Przedmiot badań stanowiły aminy biogenne, ważna grupa związków endogennych pełniących funkcję neuroprzekaźników, do których zalicza się

katecholaminy (adrenalinę, noradrenalinę oraz dopaminę), ich metabolity i metoksykatecholaminy, a także serotoninę oraz histaminę. Oznaczanie wolnych katecholamin w moczu jest wykorzystywane w diagnostyce guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy, nerwiaka zarodkowego, przyzwojaka, a także choroby Alzheimera, Parkinsona, łysienia plackowatego, czy choroby Hashimoto [wstęp teoretyczny, rozdział 1]. Analiza amin biogennych i ich metabolitów jest pomocna w diagnostyce zaburzeń OUN, guzów neuroendokrynych czy nowotworów. Oznaczanie ich stężenia może być pomocne w prognozowaniu remisji klinicznej po chemioterapii przedoperacyjnej lub potwierdzeniu nawrotu nowotworu [P2 wprowadzenie i cel].

Format recenzowanej rozprawy doktorskiej jest typowy dla rozpraw doktorskich przygotowanych w oparciu o cykl publikacji naukowych. Praca doktorska opatrzona jest wstępem teoretycznym, następnie zarysowano cel pracy, przedstawiono materiały i metody oraz **omówiono wyniki w oparciu o publikacje składające się na rozprawę doktorską**. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach zostało zaprezentowane w formie skróconej, ale w ujęciu klasycznym przedstawiając wprowadzenie i cel, wyniki oraz wnioski, bez rycin i tabel, ale z odniesieniem do poszczególnych artykułów naukowych. Piśmiennictwo liczy 85 pozycji, bardzo aktualnych, co dowodzi, że Doktorantka śledzi na bieżąco postęp naukowy w światowych artykułach naukowych. Wstęp teoretyczny przedstawiono na 19 stronach maszynopisu, został podzielony na cztery rozdziały: (1) badane anality – aminy biogenne i ich metabolity (neurotransmitery), (2) elektroforeza kapilarna – zalety i wady techniki, (3) techniki ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej – wzmocnienie sygnału offline, (4) cieczy jonowe. W rozdziale czwartym wyodrębniono następujące podrozdziały: (4.1) charakterystyka cieczy jonowych (dyskusyjna rycina 3 z zaklasyfikowaniem funkcji: modyfikacji krzemionkowej powierzchni kapilary do właściwości biologicznych cieczy jonowych), (4.2) budowa i podział cieczy jonowych (recenzentka w tym zakresie dostrzega brak wzorów strukturalnych cieczy jonowych stosowanych przez Doktorantkę na etapie optymalizacji ekstrakcji, czy użytych do poprawy powtarzalności czasów migracji), (4.3) zastosowanie cieczy jonowych, (4.4) cieczy jonowe w ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej oraz (4.5) cieczy jonowe w elektroforezie kapilarnej.

Wstęp jest dobrze przemyślany, logiczny, w większości poprawnie napisany pod względem stosowania właściwej terminologii analitycznej, z zachowaniem ciągu przyczynowo skutkowego, a piśmiennictwo przedstawia aktualny stan wiedzy. Natomiast Doktorantka nie ustrzegła się kilku błędnych sformułowań. Jeden z przykładów niewłaściwie zastosowanej terminologii dotyczy sformułowania, „czas nastryku próbki do kapilary” [wstęp teoretyczny, rozdział 2] zamiast dozowanie próbki, czy wprowadzenie próbki do kapilary metodą elektrokinetyczną czy hydrodynamiczną. Inny przykład niewłaściwego sformułowania to leki farmaceutyczne [wstęp teoretyczny, podrozdział 4.3], właściwości protonowo-aprotyczne [wstęp teoretyczny, podrozdział 4.5], podczas gdy prawidłowa klasyfikacja rozpuszczalników pod względem własności kwasowo-zasadowych to: amfiprotyczne i aprotyczne, albo protonowo-aprotone (protyczne-aprotyczne). Orędownikami stosowania właściwej terminologii w zakresie nauk ścisłych byli wspaniali nauczyciele akademicki Pani Prof. Ewa Bulska i Pan Prof. Jacek Namieśnik.

Tematyka badań naukowych obejmowała zastosowania cieczy jonowych (IL) do ekstrakcji i rozdzielania metodą micelarnej chromatografii elektrokinetycznej (MEKC) amin biogennych. Ciecze jonowe zostały dodane do próbki badanej na

etapie izolacji amin biogennych z matrycy biologicznej, a następnie desorpcji w celu poprawy wydajności procesu ekstrakcji oraz osiągnięcia korzystnego wpływu na współczynnik załężania ekstrahowanych analitów (P1, P2, P3). Natomiast w pracy P4 i P5 ciecze jonowe zostały dodane w różnych stężeniach do roztworu podstawowego elektrolitu (BGE) w celu zwiększenia powtarzalności, a także zwiększenia sygnału i polepszenia czułości metody.

BGE składał się z mieszaniny buforu tetraboranu sodu (P1 i P2) z kwasem bornym (P3, P4 i P5) oraz z dodatkiem dodecylosiarczanu sodu (SDS, w stężeniu powyżej CMC) z dodatkiem metanolu, jako modyfikatora organicznego (P1 – P5) w zakresie pH 9,39 - 7,27 oraz suplementowany cyklodekstryną (P1, P2) w celu polepszenia rozdzielania substancji niepolarnych i nierozpuszczalnych w buforze, a wnিকających w micle, natomiast w publikacjach P4 i P5 BGE został suplementowany cieczą jonową. Detekcja była spektrofotometryczna z detektorem z matrycą diodową, a kapilarę stanowiła niepowlekania kapilara z topionej krzemionki. Doktorantka zastosowała wybrane ciecze jonowe (chlorek 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy i tetrafluoroboran 1-heksyl-3-metyloimidazoliowy), jako czynniki dynamicznie powleające kapilarę w analizie amin biogennych w próbkach moczu pochodzących od pacjentów onkologicznych (P5).

Głównym powodem opracowania nowych rozwiązań była konieczność poprawy czułości metody analitycznej opartej na MEKC, ponieważ jest to istotne ograniczenie kapilarnych technik elektromigracyjnych w połączeniu z detekcją UV dla związków, których stężenie w matrycy próbki badanej jest niskie. Doktorantka stosowała trzy techniki ekstrakcyjne mające na celu wstępną izolację oraz wzbogacanie analitów (załężania próbki) off-line: ekstrakcję do fazy stałej (SPE, w P3 i w P5 ze złożem hydrofilowo-lipofilowym, HLB), mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME w P1, dla dwóch typów złoża C18 oraz dla kopolimeru polistyrenu i diwinylobenzenu (PS-DVB) oraz w P3) oraz dyspersyjną mikroekstrakcję w układzie ciecz-ciecz (DLLME, w P3). Wydajność procesu ekstrakcji zależy przede wszystkim od rodzaju i objętości zastosowanego ekstrahenta oraz użytego rozpuszczalnika dyspersyjnego. Dla polepszenia efektywności ekstrakcji na etapie optymalizacji procesu ekstrakcji Doktorantka wprowadziła dodatek cieczy jonowych do fazy desorbującej.

W P1 oraz P2, gdzie Doktorantka dokonała walidacji zoptymalizowanej metody opisanej w P1 rozpuszczalnik organiczny użyty do desorpcji analitów z powłoki PS-DVB stanowił metanol wzbogacony o ILs. Doktorantka udowodniła, że istotny wpływ na skuteczność ekstrakcji ma długość łańcucha alifatycznego w kationowych strukturach z pierścieniem imidazoliowym użytej cieczy jonowej ze wskazaniem przewagi dla krótkiego, etylowego łańcucha IL oraz rodzaju anionu budującego daną ciecz jonową. Z trzech badanych ILs wybrała jedną, oznaczoną jako IL2 w stężeniu 20 ng/mL, jako najbardziej optymalnym, poprawiającym wydajność ekstrakcji wszystkich analitów podczas ich jednoczesnej izolacji. Doktorantka tym samym udowodniła, że IL mogą służyć jako obiecujące dodatki podczas mikroekstrakcji, procedury oczyszczania i wstępnego wzbogacania amin biogennych izolowanych z materiału biologicznego.

Doktorantka w P1 oznaczała trzy aminy biogenne dopaminę (DA), adrenalinę (A), noradrenalinę (NA) wraz z ich prekursorem L-Tyr oraz L-Tryp, będącego prekursorem serotoniny w próbkach moczu pacjentów pediatrycznych (n=10) cierpiących na nerwiaka niedojrzałego (neuroblastoma), ganglioneuroblastomę, guza Wilmsa, guza rabdoidalnego, lipoblastomatozę oraz u zdrowych ochotników. Metoda została zwalidowana (P2) w zakresie liniowości, czułości, precyzji pośredniej oraz

dokładności potwierdzając, tym samym, że opracowana metoda nadaje się do zamierzonego celu – oznaczania wybranych amin biogennych oraz wykrycia nieprawidłowości w ich stężeniach w biologicznych próbkach moczu zdrowych ochotników i pacjentów z rozpoznaniem nowotworów neuroendokrynnych: nerwiakiem niedojrzałym, guzem Wilmsa i lipoblastomatozą.

W P3 Doktorantka opracowała i zoptymalizowała metodę ekstrakcji dla siedmiu metabolitów L-Tyr: glikolu dihydroksyfenylowego (DHPG), glikolu 3-metoksy-4-hydroksyfenylowego (MHPG), kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), kwasu wanilinomigdalowego (VMA), kwasu homowanilinowego (HVA), normetanefryny (NM) oraz metanefryny (M) z próbek biologicznych. W tym celu Doktorantka użyła tych samych imidazoliowych ILs o różnej długości łańcucha alifatycznego w podstawniku kationu oraz anionem tetrafluoroboranowym lub bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowym, co w P1 i P2, jako dodatki do fazy desorbującej w SPME. Zastosowała anionowy środek powierzchniowoczynny (SDS) powyżej jego minimalnego stężenia tworzącego micelle (CMC).

Rozdzielanie składników w MEKC zachodzi na zasadach podobnych, jak w metodach chromatograficznych z odwróconym układem faz. Podział tych składników zachodzi pomiędzy micelle i bufor, a micelle migrując oddziałują z analitami hydrofobowo i elektrostatycznie. Składniki hydrofobowe wnikają w micelle, hydrofilowe pozostają w buforze, a składniki o pośrednich właściwościach częściowo wnikają w micelle, a częściowo pozostają w buforze. Im silniej oddziałuje analit z micelą, tym dłuższy jest czas jego migracji, gdyż micela o ujemnym ładunku hamuje na zasadzie przeciwprądu jego migrację z EOF. Dlatego trudno jest się zgodzić ze stwierdzeniem Doktorantki, że w pH 7,3 glikol DHPG, glikol MHPG, kwas VMA, kwas HVA były kationami, a kwas DOPAC, normetanefryna (NM) oraz metanefryna (M) były anionami, i te pierwsze (kationy) nie oddziaływały z hydrofobowym wnętrzem miceli (pomimo różnic, anion-kation), stąd miały krótsze czasy migracji, niż te, które były anionami. Gdyby tak było w rzeczywistości to w pierwszym przypadku obserwowalibyśmy przyciąganie, a w drugim odpychanie elektrostatyczne pomiędzy badanymi analitami a SDS-em, biorąc pod uwagę jedynie ładunek analitu i ładunek miceli, zakładając jedynie mechanizm oparty na oddziaływaniach elektrostatycznych, a nie uwzględniając oddziaływań hydrofobowych. Silniejsze oddziaływanie elektrostatyczne (kation-anion) powodowałoby późniejszą migrację, a brak oddziaływania pozostanie analitu w roztworze i poruszanie się do detektora z siłą przepływu EOF. Co więcej glikol DHPG, jak i kwasy VMA i HVA nie mają aminowych grup funkcyjnych, które mogłyby ulegać jonizacji w tych warunkach pH.

DOPAC, DHPG powstają w wyniku enzymatycznej deaminacji dopaminy i noradrenaliny przez monoaminooksydazę (MAO), z kolei ich metabolity pozbawione już grupy aminowej ulegają dalszym przekształceniom przez enzym katecholo-O-metyltransferazę (COMT) do kwasu HVA, glikolu MHPG, a ten dalej do kwasu VMA. Tylko metabolity noradrenaliny i adrenaliny, odpowiednio O-metylowane, NM i M pod wpływem działania COMT zachowują podstawnik z grupą aminową i tylko one w wyniku dysocjacji w warunkach pH niższego od ich wartości pKa mogą posiadać ładunek dodatni.

W P3 zespół badawczy przetestował 25 różnych rozwiązań ekstrakcyjnych z zastosowaniem ekstrakcji typu: DLLME (jedną), SPE (13, w tym: 4 z użyciem sorbentu HLB, 5 ze złożem C18, 4 ze złożem CN) oraz SPME (11, w tym: 4 ze złożem C18, 7 ze złożem PS-DVB) oraz różnymi układami ekstrahentów i eluentów/desorbentów. Tylko trzy różne ciecze jonowe zastosowano w przypadku trzech ekstrakcji (3/25) typu SPME, tylko z jednym typem złoża PS-DVP. Co

zdecydowało o zastosowaniu cieczy jonowych jedynie w ekstrakcji typu SPME ze złożem PS-DVB? W każdym przypadku eluentem był MeOH z jedną z trzech cieczy jonowych. Oceniane metody ekstrakcji porównano przez obliczenie uzyskanych wartości współczynników załężania (EF). Dla ekstrakcji SPE najbardziej efektywne było złoże C18 z MeOH jako eluentem dla DHPG, VMA, HVA, NM i DOPAC, dla SPME sorbent PS-DVB w połączeniu z MeOH był najlepszy dla M i MHPG, natomiast SPME z MeOH+IL3 zwiększył wydajność dla M, nie zmienił dla DHPG i NM, ale też nie zwiększył wydajności dla pozostałych: VMA, MHPG, HVA i DOPAC.

W pracach P4 i P5 Doktorantka dodała ILs w zakresie stężeń 1 - 20 mM (jakie jest stężenie CMC poszczególnych ILs dodawanych do BGE? Czy zakres stężeń 1 - 20 mM był wystarczający do tworzenia miceli, czy do modyfikacji przepływu EOF? W Tabeli 1 P4 wskazano wartość CMC tylko dla jednej z 13-stu zastosowanych cieczy jonowych, dla siarczanu metylu 1-butylo-3-metyloimidazoliowego), do BGE w celu poprawy powtarzalności czasów migracji dla siedmiu metabolitów amin biogennych: HVA, VMA, NM, M, DHPG, MHPG i DOPAC, tych samych, co w publikacji P3. Doktorantka przetestowała 13 cieczy jonowych o różnej budowie, głównie kationów zawierających pierścień imidazolu z różnymi podstawnikami alkilowymi i różnymi anionami, ale również IL z kationem pirydyniowym. Ciecze jonowe z kationem imidazoliowym dawały lepsze rezultaty niż zastosowanie BGE z dodatkiem cieczy jonowej z kationem pirydyniowym. Zespół badawczy uzyskał wyniki porównywalne do wcześniejszych wyników literaturowych, tzn. czas migracji analitów maleje wraz ze wzrostem stężenia oraz długości łańcucha alkilowego w pierścieniu imidazolowym, ponieważ skuteczność tych ILs w blokowaniu grup silanolowych jest zwykle wyższa, gdy łańcuch alkilowy w pozycji C1 pierścienia imidazolowego jest dłuższy. Doktorantka do dalszych badań wybrała IL z kationem imidazoliowym z podstawnikiem heksylovym, jako optymalny kation budujący ciecz jonową do elektroforetycznego rozdzielania badanych związków. Doktorantka optymalizowała również wybór anionu budującego IL, który działa na zasadzie przeciwjonu, wpływając tym samym na prędkość EOF i selektywność rozdzielania. Wyniki wykazały, że alkiloimidazolowe ILs zawierające hydrofilowe aniony dobrze się rozpuszczają w BGE, stabilizując w ten sposób EOF poprzez dynamiczną modyfikację powierzchni kapilary. Natomiast ILs zawierające anion hydrofobowy słabo rozpuszczają się w BGE i zakłócają przepływ prądu przez kapilarę. Doktorantka spośród 13 testowanych ILs wybrała chlorek 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy (zamiast chlorek 1-hexyl-3-metylimidazoliowy) oraz tetrafluoroboran 1-heksylo-3-metyloimidazoliowy. Przy dynamicznym powlekanu kapilary kationowym związkiem powierzchniowo czynnym, tj. kationowe ciecze jonowe poniżej ich stężenia CMC dochodzi do zmiany kierunku przepływu EOF, tzw. odwrócenia przepływu elektroosmotycznego, i wówczas istnieje konieczność zmiany polaryzacji elektrod w wyniku czego na wlocie do kapilary jest katoda, a na wylocie jest anoda i przepływ EOF odbywa się we właściwym kierunku. Brak informacji w tym zakresie w opracowaniu przygotowanym przez Doktorantkę. Pytanie do Doktorantki, jaka była polaryzacja elektrod, i czy w zastosowanym stężeniu IL zmieniła kierunek przepływu EOF?

W P5 Doktorantka oznaczała zawartość wybranych metabolitów BAs (M, NM, HVA i VMA) w moczu pacjentów pediatrycznych (n=8) ze zdiagnozowanym nowotworem neuroendokrynnym typu neuroblastoma stosując BGE suplementowane wybranymi ILs w stężeniu 1 mM. Doktorantka oceniała wpływ dwóch wyselekcjonowanych cieczy jonowych z kationem imidazoliowym i różnymi anionami, chlorkowym i tetrafluoroboranowym [HMIM⁺Cl⁻], [HMIM⁺BF₄⁻]. Doktorantka wskazała, że optymalizacja składu buforu została opisana w publikacji P3, wskazując wartość

pH BGE 7,3 (P3) oraz pH 7,27 w P4 i P5. Jaka była niewrażliwość/odporność metody (robustness/ruggedness) na niewielkie zmiany składu BGE oceniana w trakcie walidacji metody analitycznej? Parametru tak istotnego na etapie odtwarzalności metody analitycznej.

Podczas optymalizacji warunków ekstrakcji BAs wykorzystano sztuczny moczu wzbogacony roztworami odniesienia badanych metabolitów amin biogennych. Doktorantka dowiodła, że dodanie IL z anionem chlorkowym zapewniło lepszą powtarzalność czasów migracji niż w przypadku anionu tetrafluoroboranowym. Wyniki uzyskane podczas walidacji metody wykazały, że [HMIM⁺Cl⁻] w porównaniu do [HMIM⁺BF₄⁻] powodują nieznaczny wzrost sygnałów badanych związków. Doktorantka oznaczyła VMA, HVA, M i NM w zakresie stężeń 0,16 – 16,27 µg/mL oraz określiła stosunek VMA do HVA, którego niska wartość wiąże się z niekorzystnym rokowniczo poziomem u pacjentów poniżej pierwszego roku życia. Znacznie podwyższone wartości M i NM oraz niska wartość VMA/HVA dowiodły potencjalnych korzyści z monitorowania poziomów stężeń BAs w płynach ustrojowych pacjentów z guzem neuroendokrynnym.

W P5 Doktorantka wzbogacała analit korzystając z techniki SPE ze złożem HLB w celu oznaczania metabolitów amin biogennych w moczu pacjentów onkologicznych. Czy to oznacza, że etap ekstrakcji optymalizowany w P3, gdzie Doktorantka udowodniła, że SPE ze złożem C18 było najbardziej efektywnym złożem dla oznaczania amin biogennych (DHPG, VMA, HVA, NM i DOPAC) w materiale biologicznym był jednak złożem nie najbardziej optymalnym?

Podsumowanie:

1. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauki farmaceutyczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej określone w art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, z dn. 20 lipca 2018 r.

2. Rozprawa doktorska jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, które ma potencjalne zastosowanie w sferze gospodarczej i społecznej.

Stosownie do wymagań określonych w rozdziale 3 §14, ust. 2 Uchwały GUMed Nr 90/2020 artykuły naukowe powinny być opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych o zasięgu krajowym lub międzynarodowym. W skład dorobku naukowego kandydata do stopnia doktora winna wchodzić co najmniej jedna publikacja pełnotekstowa (w tym co najmniej jedna, w której kandydat jest pierwszym autorem) w recenzowanym czasopiśmie naukowym z co najmniej Q2 lub dorobek naukowy kandydata powinien wynosić co najmniej 2,0 pkt. IF.

Publikacje wchodzące w skład niniejszej dysertacji doktorskiej mają wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną. Pani mgr Natalia Kaczmarczyk jest współautorką 5 publikacji (z deklarowanym wkładem na poziomie 20 – 30%) z Listy Filadelfijskiej (IF **22,784**; **MEiN 360**), w trzech tych pracach była pierwszym autorem. O wysokiej wartości publikacyjnej Doktorantki, jako współautorki świadczą cztery publikacje opublikowane w prestiżowych, międzynarodowych czasopismach zaliczanych do kwartyłu Q1 i jednej do Q2.

Na duże uznanie zasługuje aplikacyjność wyników badań Doktorantki, która obok czysto naukowego (poznawczego) podejścia realizuje również drugi istotny element pracy doktorskiej, to jest potencjalne zastosowanie wyników badań w sferze

społecznej. Metody opracowane przez Doktorantkę i możliwość ich zastosowania w diagnostyce guzów neuroendokrynnych, które obok metod diagnostyki laboratoryjnej (ocena poziomu chromograniny A) czy metod obrazowych tj. USG, tomografia komputerowa, enterografia, scyntygrafia z wykorzystaniem analogów somatostatyny, czy badanie pozytonowej emisyjnej tomografii może stanowić komplementarne narzędzie diagnostyczne. Tym bardziej, że guzy neuroendokrynne to bardzo trudne w rozpoznaniu nowotwory, rozwijające się powoli, dające niespecyficzne objawy lub mogące przebiegać bezobjawowo. Z tego powodu rozpoznawane są późno, gdy choroba jest zaawansowana lub są wykryte przypadkowo. Możliwość wykorzystania metod opracowanych przez Doktorantkę w celach diagnostycznych, bądź do oceny potencjalnej odpowiedzi nowotworów neuroendokrynnych na leczenie, do oceny skuteczności leczenia, czy stabilizacji choroby lub oceny progresji wydaje się bardzo interesującym rozwiązaniem rzutującym na sukces terapii.

Do rozprawy doktorskiej dołączone zostały streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis **15 streszczeń prac wieloautorских** ze zjazdów międzynarodowych i krajowych zamieszczonych w materiałach naukowych sympozjów. W pięciu z nich Doktorantka była pierwszym autorem, a dla dwóch streszczeń Pani mgr Natalia Kaczmarczyk przedstawiła ustną prezentację podczas cyklicznych zjazdów w trakcie międzynarodowych spotkań interdyscyplinarnych poświęconych bioanalizie (Gdańsk, 2019) oraz w ramach XV konferencji dotyczącej problematyki analizy przepływowej (Kraków, 2022).

Uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Kaczmarczyk, pt. „Zastosowania cieczy jonowych do ekstrakcji i rozdzielania metodą MEKC amin biogennych” odpowiada wymogom stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora, określone w art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, z dn. 20 lipca 2018 r. (Dz.U.2023.742).

Z przyjemnością przedkładam, przeto Przewodniczącemu Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Panu Prof. dr hab. Wiesławowi Sawickiemu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kaczmarczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



dr hab. Katarzyna Michalska, prof. NIL