



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Michał Woźniakiewicz, prof. UJ
Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Jagielloński
Ul. Gronostajowa 2, 30-387 Kraków

Kraków, 27 lipca 2023

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Kaczmarczyk
zatytułowanej**

Zastosowanie cieczy jonowych do ekstrakcji i rozdzielania metodą MEKC amin biogennych

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Kaczmarczyk została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. n. farm. Ilony Olędzkiej. Dotyczy ważnego i interesującego zagadnienia wykorzystania cieczy jonowych w rozwijaniu i opracowywaniu nowoczesnych metod ekstrakcji i analizy z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych do oznaczania amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów z matrycy biologicznej. Badania naukowe do przedstawionej pracy zrealizowano w uznanym ośrodku badawczym od wielu lat specjalizującym się w rozwoju technik przygotowania próbek i analizie chemicznej wykorzystującej techniki elektromigracyjne.

Aminy biogenne pełniące rolę neuroprzekaźników w organizmie – główny obiekt badań Autorki, to związki organiczne, które powstają m.in. w wyniku biotransformacji aminokwasów. Wybrane do badań monoaminy to katecholaminy, takie jak: dopamina, noradrenalina i adrenalina. Powstają one z L-tyrozyny i w organizmie ulegają dalszej biotransformacji do kolejnych substancji z udziałem różnych enzymów, na drodze metabolizmu w przewodzie pokarmowym, układzie nerwowym lub układzie gruczołów dokrewnych. W pierwszym etapie katecholaminy mogą ulegać m.in. metoksylacji dzięki aktywności enzymu katecholo-O-metylotransferazie oraz utlenianiu dzięki oksydazie monoaminowej. Powstałe produkty mogą być dalej metabolizowane przez te enzymy tworząc, wraz prekursorami i aminami biogennymi, szczególną grupę związków. Ich monitorowanie może być pomocne w diagnostyce wielu guzów neuroendokrynogennych, których komórki mają tendencję do patologicznego wzrostu wydzielania amin biogennych. Związki te oznaczane są również w trakcie diagnostyki wielu innych schorzeń, takich jak choroba Alzheimerera, Parkinsona czy Hashimoto, które stanowią

poważne wyzwania współczesnej medycyny. Nie ma więc wątpliwości, że **temat badawczy podjęty przez Panią mgr Natalię Kaczmarczyk jest tematem oryginalnym i bardzo aktualnym**, zwłaszcza w połączeniu z drugą grupą związków, czyli cieczami jonowymi, których zastosowanie jako zielonych alternatyw dla rozpuszczalników organicznych i modyfikatorów metod elektrokinetycznych stale rośnie.

Rozprawa doktorska została przygotowana w nowoczesnej formie zbioru 5 prac naukowych, składających się na monotematyczny cykl, opublikowanych w renomowanych czasopismach wydawnictw Elsevier (4 prace, czasopisma Q1 w zakresie chemii analitycznej wg listy JCR) i MDPI (1 praca, czasopismo Q2 w zakresie farmakologii i farmacji wg listy JCR). Ich łączny współczynnik oddziaływania (*impact factor*) wg indeksu wydanego na rok 2022 to 22,3 co jest bardzo dobrym wynikiem, pokazującym zaangażowanie Doktorantki w publikowanie w najlepszych czasopismach naukowych. O wysokim oddziaływaniu przedstawionych prac świadczy także ich cytowalność: pomimo stosunkowo niedługiego czasu od wydania pierwszej pracy, łączna liczba cytowań wg bazy Scopus wynosi 30 (bez autocytowań autorów).

Zbiór prac poprzedzony został obszernym wprowadzeniem (71 stron, 3 rysunki, 85 pozycji cytowanej literatury) przybliżającym czytelnikowi teorię opisującą przedmiot badań, metodykę badawczą oraz zawierającym omówienie pięciu prac składających się na monotematyczny cykl. Przedstawiony w pracy cel ogólny obejmuje zaproponowanie nowych rozwiązań analitycznych z zastosowaniem cieczy jonowych podczas izolacji z matrycy biologicznej oraz separacji elektroforetycznej istotnych klinicznie amin biogennych, ich prekursorów i metabolitów. Cele szczegółowe obejmują: (i) opracowanie warunków ekstrakcji z uwzględnieniem wykorzystania cieczy jonowych do poprawy tego procesu; (ii) analizę próbek klinicznych z wykorzystaniem optymalnej procedury ekstrakcyjnej; (iii) ocenę wpływu cieczy jonowych jako dodatków do buforu separacyjnego na proces elektroforetycznego rozdzielania badanych związków; (iv) zbadanie zastosowania wybranych cieczy jonowych do dynamicznego pokrywania kapilary w analizie amin biogennych i ich metabolitów w próbkach moczu pacjentów onkologicznych.

Pierwsza publikacja z cyklu, pod tytułem „*Ionic liquids as signal amplifiers for the simultaneous extraction of several neurotransmitters determined by micellar electrokinetic chromatography*” autorstwa Miękus N., Olędzka I., **Kossakowska N.**, Plenis A., Kowalski P., Prahl A., Bączek T. ukazała się w roku 2018 w renomowanym czasopiśmie Talanta wydawnictwa Elsevier. Praca ta stanowi cenny wkład w badania z zakresu chemii analitycznej w kontekście zastosowania cieczy jonowych w procesach ekstrakcji wybranych, trzech amin biogennych (dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny) i ich prekursorów. W pracy tej skupiono się na opracowaniu skutecznej metody mikroekstrakcji do fazy stałej, SPME, wykorzystując cieczy jonowe na bazie pochodnych imidazolu (kation) do wzbogacenia fazy desorbującej anality. Wkład merytoryczny Pani mgr Natalii Kaczmarczyk polegał na udziale w pracach badawczych oraz przygotowaniu manuskryptu i odpowiedzi na recenzje. Publikacja ta dostarcza cennej, nowej wiedzy na temat zastosowania dodatków cieczy jonowych w procesach mikroekstrakcji neuroprzekazników. Praca ta stanowi istotny wkład w rozwój analiz amin

biogennych, otwierając nowe możliwości dla przyszłych badań i zastosowań, co znajduje odzwierciedlenie w kolejnych pracach Doktorantki.

Druga publikacja składająca się na cykl, pt. „*Application of SPME supported by ionic liquids for the determination of biogenic amines by MEKC in clinical practice*” autorstwa **Kossakowska N.**, Olędzka I., Kowalik A., Miękus N., Kowalski P., Plenis A., Bień E., Kaczorowska A., Krawczyk M. A., Adamkiewicz-Drożyńska E., Bączek T. ukazała się w 2019 roku w czasopiśmie *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Praca ta prezentuje wyniki walidacji metody ekstrakcji SPME wspomaganą cieczami jonowymi, połączonej z rozdzielaniem analitów za pomocą micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej MEKC. Dzięki współpracy z Kliniką Pediatrii, Hematologii i Onkologii UCK/GUMed, po walidacji, metoda ta została zastosowana do oznaczania amin biogennych i ich prekursorów w próbkach moczu pacjentów pediatrycznych cierpiących na różne nowotwory, takie jak nerwiak niedojrzały, ganglioneuroblastoma, guz Wilmsa, guz rabdoidalny czy lipoblastomatoza. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, że metoda może być skutecznie wykorzystana do wyznaczenia stężeń amin biogennych i prekursorowych aminokwasów w próbkach moczu, dostarczając cennych informacji diagnostycznych, pozwalających na zróżnicowanie pacjentów względem grupy kontrolnej. Nie ma wątpliwości, że praca ta stanowi ważny wkład w dziedzinę chemii medycznej, analitycznej i diagnostyki, a udział merytoryczny Pani mgr Natalii Kaczmarczyk był wiodący i obejmował prowadzenie ekstrakcji analitów, analizy techniką MEKC, zabieranie i opracowanie wyników pomiarów, przeprowadzenie walidacji metody oraz przygotowanie manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów.

Publikacja trzecia pt. „*Extraction and preconcentration of compounds from the L-tyrosine metabolic pathway prior to their micellar electrokinetic chromatography separation*” autorstwa Miękus N., Plenis A., Rudnicka M., **Kossakowska N.**, Olędzka I., Kowalski P., Bączek T. została opublikowana w jednym z najważniejszych czasopism poświęconych technikom separacyjnym, *Journal of Chromatography A*. Praca ta prezentuje wyniki badań nad optymalizacją procedury ekstrakcji z próbek biologicznych siedmiu substancji ze szlaku metabolicznego L-tyrozyny, w tym istotnych metabolitów katecholamin. W publikacji przedstawiono różne modyfikacje procedur trzech technik ekstrakcji: SPME, SPE i DLLME celem wybrania metody o najwyższej efektywności. Należy stwierdzić, że publikacja ta dostarcza wartościowych wyników na temat rozważań o skuteczności różnych technik ekstrakcji w izolacji amin biogennych z próbek moczu. Wkład merytoryczny Pani mgr Natalii Kaczmarczyk w badania obejmował przede wszystkim prace eksperymentalne oraz udział w redagowaniu manuskryptu i odpowiedzi na pytania recenzentów.

Publikacja czwarta pt. „*The critical evaluation of the effects of imidazolium-based ionic liquids on the separation efficiency of selected biogenic amines and their metabolites during MEKC Analysis*” autorstwa **Kaczmarczyk N.**, Ciżewska J., Treder N., Miękus N., Plenis A., Kowalski P., Roszkowska A., Bączek T., Olędzka I. została wydana w roku 2022 w czołowym czasopiśmie analitycznym *Talanta*. Praca ta koncentruje się na ocenie wpływu cieczy jonowych jako dodatków do elektrolitu podstawowego podczas rozdzielania amin biogennych (BAs) metodą MEKC. W opisanych badaniach przeprowadzono szczegółową ocenę wpływu

trzynastu cieczy jonowych o różnorodnej budowie chemicznej na skuteczność procesu rozdzielania elektroforetycznego, w tym na powtarzalność czasów migracji, wybranych 7 związków ze szlaku metabolicznego L-tyrozyny. Publikacja ta dostarcza istotnych wyników eksperymentalnych wskazujących na skuteczność stosowania cieczy jonowych jako dodatków podczas analizy CE wybranych pochodnych katecholamin, co ma kluczowe znaczenie dla poprawy efektywności i powtarzalności ich rozdzielania. Wkład merytoryczny Pani mgr Natalii Kaczmarczyk w przedmiotową pracę należy ocenić jako wiodący: brała udział w opracowaniu koncepcji badawczej i metodologii prowadzenia eksperymentów, zbieraniu wyników badawczych oraz redagowaniu manuskryptu i odpowiedzi dla recenzentów.

Publikacja piąta zatytułowana „*Investigation of imidazolium-based ionic liquids as additives for the separation of urinary biogenic amines via capillary electrophoresis*” autorstwa **Kaczmarczyk N.**, Treder N., Kowalski P., Miękus N., Plenis A., Roszkowska A., Bączek T., Olędzka I. ukazała się w roku 2023 w czasopiśmie *Separations*. Praca ta skupia się na zastosowaniu cieczy jonowych jako dodatków do buforu separacyjnego w procesie oznaczania czterech pochodnych katecholamin. W badaniach skupiono się na dwóch imidazoliowych cieczach jonowych z różnymi anionami, które wykorzystano do separacji badanych związków w moczu pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowanym nowotworem neuroendokrynnym typu neuroblastoma. Wkład merytoryczny Doktorantki do przedstawionej pracy należy określić jako wiodący i obejmował on udział w przygotowaniu koncepcji i metodologii oraz walidacji metody analitycznej, a także przygotowanie manuskryptu i odpowiedzi na recenzje.

Podsumowując, należy stwierdzić, że w czasie realizacji badań i eksperymentów zaplanowanych w ramach przedłożonej rozprawy doktorskiej, **Pani mgr Natalia Kaczmarczyk osiągnęła założone cele**. Doktorantka udowodniła, że ekstrakcja SPME wspomagana dodatkiem tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego w stężeniu 20 ng/mL umożliwia skuteczną izolację badanych amin biogennych i ich prekursorów z próbek moczu, jednocześnie znacznie poprawiając wydajność procesu izolacji tych związków. Ponadto, Doktorantka wykazała użyteczność zastosowania cieczy jonowych jako składnika desorbentu w mikroekstrakcji do fazy stałej, co skutkowało znacznym zatężeniem badanych związków i umożliwiło obniżenie granicy wykrywalności. Dzięki zastosowaniu analizy chemometrycznej (hierarchiczna analiza skupień) Autorka wykazała, że ekstrakcja SPE na złożu C18 z zastosowaniem metanolu jako eluentu i SPME z kopolimerowym sorbentem polistyren-diwinylolobeznen z tym samym rozpuszczalnikiem do desorpcji powinny być rozważane jako alternatywne narzędzia do ekstrakcji badanych amin biogennych i ich pochodnych z próbek moczu. Dodatkowo, wzbogacenie metanolu dodatkiem bis(trifluorometylosulfonylo)imidu 1-etylo-3-metyloimidazolu w ekstrakcji SPME pozwoliło znacząco poprawić wydajność ekstrakcji siedmiu wspomnianych substancji. Doktorantka potwierdziła, że opracowana i zoptymalizowana metoda MEKC, wsparta dodatkowo o etap przygotowania próbki – SPE lub SPME z zastosowaniem dodatku cieczy jonowej, może być z powodzeniem stosowana jako technika prekoncentracji offline do jednoczesnej izolacji i oznaczania badanych związków w próbkach biologicznych, w celach diagnostycznych.

Doktorantka obszernie oceniła wpływ trzynastu testowanych cieczy jonowych o zróżnicowanej budowie kationu i anionu na wydajność rozdzielania elektroforetycznego, w tym na powtarzalność czasów migracji analitów oraz na potencjalne możliwości wzmocnienia sygnału podczas ich elektroforetycznego rozdzielania. Wykazano, że powlekanie warstwą kationową cieczy jonowej zwiększa stabilność powierzchni ścianek kapilar oraz wpływa korzystnie na powtarzalność czasów migracji analitów. W rozprawie doktorskiej wykazano również przydatność zastosowania opracowanej metody SPE-MEKC-UV, wykorzystującej elektrolit podstawowy wzbogacony o dodatek chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazolowego do elektrolitu podstawowego do monitorowania metanefryny, normetanefryny, kwasu homowanilinowego i kwasu wanilinomigdałowego w rzeczywistych próbkach moczu pobranych od onkologicznych pacjentów pediatrycznych.

Pomimo wysokiej jakości badań przedstawionych w cyklu publikacji do przygotowanego manuskryptu rozprawy wkradły się nieścisłości, które wymagają dyskusji.

Uwagi o charakterze merytorycznym

1. Dyskusji wymaga określenie „amin biogenne” stosowane w wielu miejscach rozprawy w odniesieniu do wszystkich badanych związków chemicznych. Badane związki należą co prawda do grupy amin (aminy biogenne pierwszej klasy: dopamina, adrenalina, noradrenalina oraz normetanefryna, metanefryna), ale też kwasów karboksylowych, hydroksykwasów, aminokwasów. Określanie wszystkich tych związków, nawet pozbawionych grupy aminowej, „aminami biogennymi”, oznaczanymi w pracy jako BAs, wydaje się być zbytnim uproszczeniem. Zresztą Autorka zdaje sobie z tego sprawę, określając np. kwas homowanilinowy i kwas wanilinomigdałowy jako metabolity amin biogennych (str. 20), a L-tryptofan i L-tyrozynę jako prekursorzy (str.18). W pracy pojawiają się dalej określenia m.in.: „pięciu amin biogennych: DA, A, NA, L-Tryp i L-Tyr” (str. 47); „siedmiu BAs: glikol dihydroksyfenylogowy (DHPG), glikol 3-metoksy-4-hydroksygenylogowy (MHPG), kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), kwas wanilinomigdałowy (HMA), kwas homowanilinowy (HVA), normetanefryna (NM), metanefryna (M)” (...) Obecność tych metabolitów (...)” (str. 48).
2. Na rys. 1 brakuje 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolu (MHPG), który jest związkiem ważnym z punktu widzenia prowadzonych badań oraz brany pod uwagę w analizach prowadzonych przez Doktorantkę.
3. Warto wyjaśnić, że do zakwaszania próbek moczu stosowany jest kwas chlorowodorowy (solny), a nie chlorowy, jak podano na str. 22.
4. Na rys. 3 niewłaściwie umieszczono „zdolność do modyfikacji krzemionkowej powierzchni kapilary” oraz „przyspieszacz wulkanizacji” jako „właściwości biologiczne cieczy jonowych”.
5. W tabeli 1. podano błędną jednostkę wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) określając ją jako mM/L, podczas gdy zwyczajowo już mM oznacza $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. W pracach naukowych zalecane jest stosowanie jednostek układu SI.

Uwagi językowe i edytorskie

1. W pracy wielokrotnie nazwy związków w języku angielskim mieszane są z nazwami w języku polskim, a czasami, angielskie nazwy są spolszczane. Np. na Rys.1 jest podana „dopamina”, a obok „3-methoxytyramine”; str. 53 „chlorek 1-hexyl-3-methylimidazoliowy i tetrafluoroboran 1-hexyl-3-methylimidazoliowy”; w celu pracy nazwy cieczy jonowych podano tylko w języku angielskim. W przypadku prac naukowych zalecana jest konsekwencja i poprawne stosowanie nazw polskich zawsze, kiedy tylko jest to możliwe.
2. Str. 31 zamiast „felonowych” powinno być fenyłowych.
3. Wykaz stosowanego piśmiennictwa został przygotowany bez należytej staranności. W wyniku najprawdopodobniej zastosowania menadżera piśmiennictwa, opis cytowanych prac jest niekompletny lub nieprawidłowy: [27] brak autorów i nazwy czasopisma; [47] cytowana praca doktorska ma opis całkowicie niekompletny, a tytuł pomyłony jest z charakterem cytowanego dokumentu; [48, 52, 61] niepełny opis źródła; [60] podanie jako źródła strony *Researchgate* zamiast odpowiedniego czasopisma; [78, 79] podanie nazw agencji lub ich akronimów jako autorów wytycznych.

Wymienione wyżej uwagi nie obniżają jednak wysokiej oceny przeprowadzonych badań. Podsumowując należy stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska, zakres prowadzonych badań, zawarte wyniki przeprowadzonych doświadczeń i pomiarów, sposób ich interpretacji oraz konstruowania wniosków jednoznacznie wskazują, że Pani mgr Natalia Kaczmarczyk wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych, a jej wkład w rozwój metod analizy próbek biologicznych z wykorzystaniem dodatku cieczy jonowych i techniki elektroforezy kapilarnej w badaniach analitycznych na potrzeby diagnostyki klinicznej oceniam jako istotny i oryginalny. **Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską i przedstawionymi publikacjami, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Natalii Kaczmarczyk spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018. Poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kaczmarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

