



UNIwersytet  
Opolski

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole  
tel. 077 452 71 00  
fax 077 452 71 01  
chemia@uni.opole.pl  
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek  
e-mail: [Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl](mailto:Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl)

Opole, 2021-12-06

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Pana mgra Łukasza Nuckowskiego**

zatytułowanej

**„Opracowanie metod przygotowania próbek oligonukleotydów  
antysensownych z wykorzystaniem klasycznych i nowego typu  
adsorbentów”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgra Łukasza Nuckowskiego została wykonana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Sylwii Studzińskiej, prof. UMK, jako promotora. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są zagadnienia związane z opracowaniem efektywnych procedur przygotowania próbek biologicznych do oznaczania nukleotydów z wykorzystaniem różnego typu adsorbentów.

Oznaczanie śladowych ilości substancji w różnych matrycach z wysoką precyzją i dokładnością stanowi stałe wyzwanie dla chemików analityków. Szczególne zainteresowanie budzi opracowanie efektywnych metod oznaczania związków aktywnych biologicznie, w tym leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych człowieka. Jest to bowiem istotny element badań klinicznych związanych zarówno z farmakokinetyką i toksykokinetyką, jak również z metabolizmem leków. Analiza leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych, ze względu na ich złożony i skomplikowany skład wymaga stosowania odpowiednich procedur ich przygotowania, w celu usunięcia pozostałych składników często uniemożliwiających zarówno identyfikację, jak i ilościowe oznaczanie analitów z wykorzystaniem metod

chromatograficznych. Dotyczy to również oligonukleotydów stosowanych od kilku lat jako leki w terapii antysensownej (ASO).

Ponieważ stosowane do tej pory metody przygotowywania próbek płynów fizjologicznych, (np. strącanie białek, ekstrakcja ciec-ciecz), charakteryzują się szeregiem wad i ograniczeń (niskie wartości odzysku, znaczne zużycie rozpuszczalników czy czasochłonność procesu) poszukuje się nowych, lepszych metod lub modyfikuje się już istniejące. W ostatnim czasie często stosuje się do tego celu również ekstrakcję do fazy stałej (SPE) z zastosowaniem różnego typu sorbentów, która posiada wiele zalet. Jednak również ta metoda jest złożona i czasochłonna, o często niskich wartościach odzysku. Ponadto często wymaga łączenia z innymi technikami. Uwzględniając powyższe w pełni uzasadnione jest poszukiwanie nowych materiałów do ekstrakcji nukleotydów do fazy stałej.

Recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Łukasza Nuckowskiego mieści się w tym zakresie i dotyczy opracowania nowych, skutecznych metod przygotowania próbek oligonukleotydów do analizy z wykorzystaniem powszechnie stosowanych adsorbentów oraz adsorbentów nowego typu.

Oceniana rozprawa nie została napisana w klasycznym układzie pracy doktorskiej i zgodnie z przepisami zawartymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2 stanowi spójny tematycznie zbiór 6 prac opublikowanych w prestiżowych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) poprzedzony Autoreferatem. Autoreferat to zwięzłe 36 stronicowe omówienie wyników badań zawartych w załączonych publikacjach poprzedzone krótkim wprowadzeniem pozwalającym na sformułowanie celów i założeń rozprawy. Wszystkie prace, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, to prace wieloautorskie. W materiałach zamieszczono również oświadczenia określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów publikacji. Z oświadczeń tych wynika, że w pracach tych udział Doktoranta w ich realizacji był znaczący, zarówno w realizacji, jak i w opracowaniu manuskryptów publikacji, o czym świadczy fakt, iż we wszystkich tych pracach mgr Łukasz Nuckowski jest pierwszym autorem, a w jednej z nich również autorem korespondencyjnym.

Dostarczone dokumenty, zawierają streszczenia w języku polskim i angielskim, dorobek naukowy Doktoranta, w którym wymienione są również udział w realizacji projektów badawczych, otrzymane nagrody, członkostwo w towarzystwach naukowych, zespołach i radach doktorantów oraz oświadczenia współautorów prac. Na uwagę zasługuje

fakt, iż przedstawiona w dokumentacji lista prac naukowych zawiera również 5 publikacji z listy filadelfijskiej i 1 rozdział w monografii oraz 4 prace w czasopismach spoza listy JCR, które nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej. Ponadto Doktorant przedstawił wykład na 62 Zjeździe Naukowym PTChem i 4 komunikaty konferencyjne oraz 9 posterów. Jest współautorem kolejnych 6 wykładów i komunikatów oraz 7 posterów.

Jego prace były cytowane ponad 60 razy (ponad 40 bez autocytowań), a indeks  $h=4$ , wg bazy Scopus z dnia 04.12.2021. Zdaniem recenzenta dorobek Doktoranta osiągnięty w krótkim przecieź czasie studiów doktoranckich jest więcej niż znaczący.

Zasadniczym celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie efektywnych metod przygotowania próbek oligonukleotydów, ze szczególnym uwzględnieniem oligonukleotydów stosowanych w terapii antysensownej. Zakres badań był szeroki i obejmował badanie wpływu warunków ekstrakcji do fazy stałej dla różnych technik ekstrakcji, syntezę anionowych i obojnaczych sorbentów i ich charakterystykę, badania adsorpcji i desorpcji ASO z wykorzystaniem tych sorbentów, opracowanie nowych procedur do ekstrakcji nukleotydów niezmodyfikowanych i poddanych modyfikacji chemicznej oraz zastosowanie opracowanych procedur do ich ekstrakcji z osocza ludzkiego, przed analizą z wykorzystaniem ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC).

Przystępując do realizacji tego celu mgr Łukasz Nuckowski przeprowadził dogłębne studia literaturowe dotyczące metod przygotowania próbek w analizie oligonukleotydów za pomocą chromatografii cieczowej i wraz ze współautorami opracował ciekawą pracę przeglądową zatytułowaną „*Review on sample preparation methods for oligonucleotides analysis by liquid chromatography*”. Praca to została opublikowana w *Journal of Chromatography B*, renomowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej (praca D1), co stanowiło dobrą podstawę do właściwej realizacji założonego programu badań.

Z przeprowadzonej analizy literatury wynikało, że najczęściej stosowaną metodą analizy jakościowej i ilościowej nukleotydów ASO jest chromatografia cieczowa ze spektrometrem mas jako detektorem. Jednak, ze względu na skomplikowany skład próbek rzeczywistych, konieczne jest odpowiednie oczyszczenie próbek z interferentów, w tym białek i wzbogacenie (zateżenie) analitów. Ponadto anality te charakteryzuje fakt silnego wiązania z białkami, co utrudnia proces przygotowania próbek do analizy. W literaturze

opisane są różne metody oczyszczania próbek ASO, takie jak strącanie, rozkład enzymatyczny, czy denaturację białek i ich oddzielenie z wykorzystaniem ekstrakcji cieczy. Również ekstrakcja do fazy stałej była stosowana w procedurach przygotowania próbek ASO do analizy z wykorzystaniem zarówno adsorbentów niepolarnych w trybie par jonowych, adsorbentów polarnych wykorzystujących oddziaływania hydrofilowe oraz wymienniczy jonowych, w tym cząstek magnetycznych pokrytych wymienniczem jonowym. Pomimo wielu zalet metody te charakteryzują się wieloma wadami, takimi jak czasochłonność, zużycie dużej ilości rozpuszczalników, czy często niskie wartości odzysku. Brakuje również wyników systematycznych badań wpływu różnych czynników, takich jak rodzaj adsorbentu, czy warunki prowadzenia ekstrakcji na efektywność oczyszczania i wydzielania ASO z próbek płynów fizjologicznych. Dlatego też uważam za w pełni uzasadnione podjęcie badań dotyczących zbadania wpływu warunków ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem komercyjnych adsorbentów na wydajność procesu oraz jego walidację. Miniaturyzacji procedury ekstrakcji pozwalającą na zmniejszenie ilości używanych odczynników, czy syntezy nowych adsorbentów, w tym na bazie nanocząstek magnetycznych. Opracowanie nowych procedur do ekstrakcji oligonukleotydów niemodyfikowanych i modyfikowanych, wreszcie możliwości zastosowania opracowanych procedur do ekstrakcji ASO i ich syntetycznych metabolitów z osocza ludzkiego, w celu ich oznaczania za pomocą UHPLC, zarówno w trybie par jonowych, jak i w odwróconym układzie faz (RP).

Uzyskane wyniki mgr Łukasz Nuckowski syntetycznie opisał w autoreferacie oraz obszernie przedstawił i wnikliwie omówił w pięciu publikacjach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy (prace D2-D6). Do najciekawszych wyników uzyskanych przez doktoranta zaliczam:

- Kompleksowe badania wpływu parametrów procedury ekstrakcji do fazy stałej, oligonukleotydów niemodyfikowanych i modyfikowanych, z wykorzystaniem komercyjnych adsorbentów niepolarnych w trybie par jonowych, w tym zastosowanego odczynnika do tworzenia par jonowych i rozpuszczalnika, co pozwoliło na określenie istotnych parametrów tego procesu. A także porównanie różnych adsorbentów i wykazanie, że zastosowanie adsorbentów polimerowych pozwala na większą wydajność ekstrakcji.

- Zaproponowanie mikroekstrakcji do fazy stałej (MEPS) z sorbentem w umieszczonym w igle strzykawkowej jako nowej, użytecznej procedury przygotowania próbek do analizy oligonukleotydów ASO, charakteryzującej się niewielkim zużyciem materiałów i odczynników i krótkim czasem ekstrakcji. Zoptymalizowanie procedury ekstrakcji MEPS i wykazanie jej wyższości nad standardową ekstrakcją SPE, w tym lepszą wydajnością ekstrakcji i dobrą powtarzalnością.
- Zsyntezowanie trzech nowych adsorbentów na bazie imidazoliowych cieczy jonowych, z użyciem diwinylobenzenu jako komonomera sieciującego i azobis(izobutyronitrylu) jako inicjatora reakcji polimeryzacji, zarówno tzw. sypkich, jak i naniesionych na nanocząstkach magnetycznych (PIL). Materiały scharakteryzowano wykorzystując do tego celu FT-IR, SEM i analizę elementarną. Wykazano również, że otrzymane nowe materiały sorpcyjne charakteryzują się wysokimi wartościami odzysku i dobrą powtarzalnością. Co nie mniej ważne, zastosowanie sorbentów na bazie cieczy jonowych pozwala ominąć etap wcześniejszego usuwania białek z analizowanej próbki co znacznie upraszcza procedurę ekstrakcji.
- Wykazanie użyteczności opracowanych procedur przygotowania próbek osocza do analizy oligonukleotydów ASO, stosowanych jako leki w terapii antysensownej, co wskazuje na możliwość ich zastosowania w praktyce laboratoryjnej.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokiej renomie. Niemniej jednak ma dwie uwagi/pytania do dyskusji:

Pytania te dotyczą sposobu syntezy sorbentów na bazie cieczy jonowych zwanych przez Autora sypkimi.

- Jaką metodę polimeryzacji zastosowano: w bloku, strąceniową, emulsyjną czy w zawiesinie? W otrzymanych materiałach, zarówno w autoreferacie, jak i publikacji dotyczącej tego typu sorbentów nie znalazłem informacji na ten temat?

Czy zastosowano w mieszaninie polimeryzacyjnej rozpuszczalniki, tak zwane porogeny, pozwalające na zwiększenia pojemności sorpcyjnej, a tym samym efektywności sorpcji? A jeżeli tak, to dlaczego badając struktury syntezowanych sorbentów nie określono również ich powierzchni właściwych i porowatości (średnica porów, rozkładu wielkości porów) a jedynie nie zawsze pozwalające na jej jednoznaczne określenie, spektroskopię FT-IR i skaningową mikroskopię elektronową (SEM)?

Na podstawie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy przypuszczam, że Doktorant sprawnie posługuje się językiem angielskim. Na uwagę zasługuje fakt, iż Autoreferat jest dobrze napisany i zawiera tylko nieliczne drobne błędy literowe, których nie warto nawet wymieniać.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioski wskazują, że mgr Łukasz Nuckowski wykazał umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniósł istotny wkład w rozwój badań z zakresu chemii analitycznej, a szczególnie opracowania nowych procedur wydzielenia i oznaczania oligonukleotydów, w tym oligonukleotydów antysensownych w próbkach biologicznych. Po zapoznaniu się z rozprawą mgra Łukasza Nuckowskiego **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

P. Wójcik

### **Wniosek o wyróżnienie rozprawy**

Biorąc pod uwagę znaczące osiągnięcia naukowe, które zostały szczegółowo omówione w przedstawionej recenzji oraz fakt, że jest to praca nowatorska, dojrzała, będąca dorobkiem przemyśleń i systematycznych badań wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgra Łukasza Nuckowskiego. W przedstawionej do recenzji pracy chciałbym zwrócić uwagę przede wszystkim na fakt, iż Doktorant opracował efektywne procedury przygotowania próbek do analizy oligonukleotydów antysensownych i wykazał ich zdolność do wydzielania tych substancji z próbek rzeczywistych o skomplikowanym składzie, takich jak próbki osocza. Substancje te są, ze względu na ich aktywność biologiczną, coraz częściej stosowane w terapii farmakologicznej niektórych chorób uważanych za nieuleczalne. Dlatego też niezbędne jest opracowywanie efektywnych procedur oznaczania tego typu związków, szczególnie w płynów fizjologicznych. Przedstawiana praca mieści się w tym zakresie i z tego powodu jest ważna zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia.

Pomimo tego, że prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Nuckowskiego są wieloautorskie to chciałbym również zwrócić uwagę na fakt, iż we wszystkich tych pracach jest On pierwszym autorem, a w jednej również autorem korespondencyjnym, co świadczy o tym, że udział Doktoranta zarówno w realizacji, jak i w opracowaniu manuskryptów publikacji był znaczący.

Jestem również pod wrażeniem imponującego dorobku naukowego osiągniętego w krótkim czasie studiów doktoranckich. Mgr Nuckowski jest bowiem współautorem 11 publikacji z listy filadelfijskiej, w tym 6 wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, 5 publikacji z listy filadelfijskiej i 1 rozdziału w monografii oraz 4 prac w czasopismach spoza listy JCR, które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej. Ponadto Doktorant przedstawił wykład na 62 Zjeździe Naukowym PTChem i 4 komunikaty konferencyjne oraz 9 posterów. Jest współautorem kolejnych 6 wykładów i komunikatów oraz 7 posterów.

Parametry naukowo metryczne są również wysokie, Jego prace były bowiem cytowane ponad 60 razy, a indeks  $h=4$ , wg bazy Scopus.

Biorąc powyższe pod uwagę z pełnym przekonaniem składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Nuckowskiego.