



dr hab. Irena Malinowska, prof. UMCS

Lublin, 17.08.2020

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pt.

ŁĄCZONE TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNE W ANALIZIE LEKÓW O DZIAŁANIU

PRZECIWKAZRZEPOWYM

autorstwa mgr Radosława Sadowskiego

Wykonanej w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w Katedrze Chemii

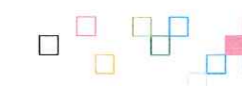
Środowiskowej

pod kierownictwem naukowym dr hab. Renaty Gadzała-Kopciuch, prof. UMK

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy badania, przy zastosowaniu różnorodnych metod chromatograficznych, składu leków przeciwzakrzepowych w celu identyfikacji wyjściowego materiału biologicznego, sposobu preparatyki preparatu oraz jego biodostępności.

Celowość podjętych badań

Skuteczność terapeutycznego działania leków zależy od rodzaju substancji czynnej, zastosowanej dawki oraz czystości związku aktywnego biologicznie. Oznaczenie substancji czynnej jest szczególnie ważne w przypadku otrzymywania leków wielkocząsteczkowych z materiału biologicznego. Lek taki może być zanieczyszczony substancjami matrycy, podczas procesu izolacji substancji czynnej z materiału biologicznego może następować transformacja tej substancji w izomery, które mogą różnić się aktywnością biologiczną, lub jak w przypadku leków będących biopolimerami – może nastąpić ich depolimeryzacja. Izolacja substancji czynnej różnymi metodami z różnego rodzaju materiału biologicznego prowadzi do otrzymania końcowego produktu o zróżnicowanym składzie jakościowym i ilościowym a w konsekwencji o różnym działaniu terapeutycznym. Dlatego też analiza jakościowa i ilościowa takich preparatów jest bardzo ważna. Problem ten jest szczególnie ważny dla leków przeciwzakrzepowych, w których heparyna – substancja czynna jest



izolowana z różnorodnego materiału biologicznego, o niezidentyfikowanej jednoznacznie formule chemicznej substancji czynnej. Zarówno jakość materiału biologicznego jak i metody izolacji z niego substancji czynnej wpływają na końcowy skład preparatu w tym samym na jego biodostępność i aktywność farmakologiczną. W ten trend badań wpisuje się tematyka badawcza doktoranta – dlatego też wybrana przez niego tematykę badawczą uważam za zasadną, tym bardziej, że badania dotyczą leków na choroby układu krążenia, które są jedną z głównych przyczyn zgonów.

Formalna ocena pracy

Przedstawiona do oceny praca jest pracą zwięzłą, przedstawioną na 90 stronach.

Rozprawa doktorska składa się z:

- wprowadzenia - w którym autor przedstawił istotę badanego przez siebie problemu,
- celu pracy – w którym autor przedstawił w sposób jasny i skondensowany cele badawcze
- syntetycznego omówienia problemów badawczych rozprawy. Ta część pracy oparta jest na 55 aktualnych pozycjach literaturowych – dotyczących składu, farmakologii oraz analizy leków przeciwzakrzepowych. Pozycje literaturowe zostały dobrze dobrane, są odpowiednio cytowane w tekście. Należy zwrócić uwagę, na to, że autor opiera się w przeważającej części na aktualnych doniesieniach literaturowych.
- tekstów 4 prac na których bazuje rozprawa doktorska,
- podsumowania i wniosków,
- streszczenia w języku polskim i angielskim,
- oświadczeń współautorów dotyczących ich udziału w realizacji publikacji, będących podstawą rozprawy doktorskiej,
- wykazu osiągnięć naukowych doktoranta,
- wykazu skrótów stosowanych w pracy.

Układ pracy jest przejrzysty, praca jest napisana poprawnie po względem technicznym, czytelna. Praca doktorska bazuje na czterech pracach opublikowanych w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym sumarycznym $IF = 9,875$ oraz $PM=280$. W pracach tych autor jest pierwszym współautorem i według załączonych oświadczeń współautorów – głównym wykonawcą.

W sumie praca liczy 90 stron z czego tekst własny autora to 25 strony, pozostałe – to skany publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów.

Zakres tematyki badawczej

Autor podjął się zadania zbadania składu preparatów przeciwzakrzepowych. Badania te polegały na jakościowej i ilościowej analizie produktów depolimeryzacji leków przeciwzakrzepowych przy użyciu metod chromatograficznych. Zakres prowadzonych badań to:



- modyfikacja metody analitycznej zalecanej w Farmakopei Amerykańskiej do analizy składu leków przeciwzakrzepowych. Zmodyfikowaną przez siebie metodę autor zastosował do przetestowania jej możliwości analitycznych do analizy (po depolimeryzacji enzymatycznej) składu nowo otrzymanych bioproduktów, w celu oznaczenia źródeł pochodzenia produktów – poprzez analizę statystyczną otrzymanych danych i porównaniu ich z materiałem referencyjnym. Autor poddał badaniu 11 próbek, które na podstawie przeprowadzonych przez siebie badań zakwalifikował do trzech grup – co może świadczyć o różnym materiale biologicznym, z których były pozyskiwane badane preparaty lub o różnej metodyce ich preparatyki. W tej samej pracy autor również przetestował zmodyfikowaną metodę do oznaczania składu trzech dostępnych handlowo preparatów przeciwzakrzepowych, różniących się sposobem depolimeryzacji – a w konsekwencji składem produktu końcowego. Badania te zastały opublikowane w pracy D2.
- przetestowanie możliwości zastosowania dendrymerycznych faz stacjonarnych do analizy niskocząsteczkowych heparyn. Zakres badań obejmował badanie możliwości separacji 8 disacharydów w układach chromatograficznych różniących się:
 - fazami stacjonarnymi – przetestowano 4 fazy stacjonarne na bazie żelu krzemionkowego modyfikowane dendrymerami o różnej liczbie związanych warstw dendrymerycznych – 1-4 warstwy,
 - fazami ruchomymi – przetestowano trzy fazy ruchome o różnym pH,
 - temperaturą pomiaru – badania prowadzone dla trzech temperatur.

Rezultatem przeprowadzonych badań był wybór optymalnego układu chromatograficznego z dendrymeryczną fazą stacjonarną do badania produktów depolimeryzacji LMWHs. Badania te zostały opublikowane w pracy D3

- opracowanie procedur otrzymywania próbek do analizy LMWHs przy pomocy depolimeryzacji enzymatycznej i chemicznej oraz analiza otrzymanego preparatu przy zastosowaniu metody IPC- UHPLC z tandemową spektrometrią mas – praca D4. W tej pracy autor badał produkty rozkładu enzymatycznego 4 preparatów LMWHs przy pomocy heparynazy I, heparynazy II oraz produkty depolimeryzacji chemicznej. Opracował również warunki oznaczania produktów depolimeryzacji przy pomocy metody chromatografii par jonowych sprzężonej z tandemową spektrometrią mas - dobierając optymalną energię zderzeń. Dokonał identyfikacji produktów depolimeryzacji. Badania te zostały opublikowane w pracy D4.

Reasumując – praca zawiera szeroki różnorodny materiał eksperymentalny. Przeprowadzone eksperymenty są opisane w pracach w sposób jasny, uporządkowany. Otrzymane wyniki przedstawione w sposób klarowny, zamieszczone na rysunkach i w tabelach.



Merytoryczna ocena pracy

Celem pracy było opracowanie metod analitycznych pozwalających na analizę oraz określenie rodzaju materiału biologicznego i procesu depolimeryzacji preparatów niskocząsteczkowej heparyny. Merytoryczną ocenę prowadzonych badań przeprowadzili już recenzenci publikacji będących podstawą pracy doktorskiej. Biorąc pod uwagę rangę czasopism w których zostały one opublikowane - zarówno pod względem merytorycznym jak i badawczym prace doktoranta zostały ocenione wysoko, co nie jest zaskoczeniem ze względu na rangę zespołu badawczego, w którym były one realizowane.

Prace badawcze to prace dotyczące analizy składu leków przeciwzakrzepowych – ich zakres badawczy został omówiony w poprzedniej części recenzji.

Na podstawie lektury publikacji będącej podstawą rozprawy doktorskiej wyraźnie widać naukowy rozwój doktoranta. Każda praca wchodząca w zakres pracy doktorskiej zawiera istotny element nowości naukowej wnoszący znaczący wkład w badania w dziedzinie zainteresowań doktoranta. Praca przeglądowa (D1), oparta na 97 pozycjach literaturowych, to kompendium wiedzy na temat analitycznych metod migracyjnych heparyn. W pracy D2 autor stosuje chromatografię SAX do analizy składu trzech komercyjnie dostępnych niskocząsteczkowych heparyn. Otrzymane wyniki badań autor porównał z wynikami otrzymanymi przy pomocy innych metod analitycznych, co świadczy o dobrej znajomości tematyki badawczej doktoranta i podwyższa poziom pracy. Autor wykazał, że opracowana przez niego metoda jest użyteczna do badań preparatów otrzymanych zarówno na drodze enzymatycznej eliminacji estru benzylowego heparyny - poprzez możliwość oznaczenia sacharydów z grupą 1,6 anhydro na końcu redukującym jak i dla preparatów otrzymanych na drodze chemicznej deaminacji – poprzez oznaczanie 2,5-anhydro-D-mannitolu. Ponadto autor przeprowadził analizę próbek niskocząsteczkowych nowych biopochodnych produktów NMWHs. Praca D3 to testowanie możliwości zastosowania nowych, o większej trwałości niż fazy SAX, dendrymerycznych faz stacjonarnych oraz opis optymalizacji układu chromatograficznego. Praca D4 to praca wykazująca możliwość zastosowania chromatografii par jonowych sprzężonej z MS do analizy produktów enzymatycznej oraz chemicznej depolimeryzacji niskocząsteczkowych heparyn. Należy wspomnieć o tym, że celem pracy autora było opracowanie metodyki depolimeryzacji heparyn.

Efektami pracy autora było:

- Zaproponowanie modyfikacji metody SAX rekomendowanej przez Farmakopeę Amerykańską do analizy LMWHs.
- Zaproponowanie nowych układów chromatograficznych z fazami dendrymerycznymi do analizy LMWHs, co pozwala na skrócenie czasu analizy w stosunku do analizy



metodą SAX, oraz pozwala na korzystanie ze znacznie trwalszych faz stacjonarnych niż SAX.

- Sporządzenie map cukrowych niskocząsteczkowych heparyn, co umożliwia identyfikację materiału biologicznego oraz sposobu preparatyki LMWHs.
- Porównanie produktów depolimeryzacji niskocząsteczkowych heparyn przez heparynazy I i II oraz wykazanie, że chemiczna depolimeryzacja również pozwala na identyfikację preparatu. Zaproponowana przez autora chemiczna depolimeryzacja jest metodą bardziej ekonomiczną ze względu na niższy koszt odczynników oraz kilkunastokrotny krótszy czas preparatyki próbki.

Na podstawie przedstawionej pracy można stwierdzić, że autor potrafi:

- posługiwać się różnymi metodami chromatograficznymi,
- zoptymalizować układ chromatograficzny,
- prowadzić szeroko zakrojone prace eksperymentalne,
- korzystać z nowoczesnych metod badawczych, w tym z metod statystycznych,
- zarządzać dużą liczbą danych,
- wyciągać logiczne wnioski z otrzymanych wyników,
- korzystać z literatury naukowej.

Na uwagę zasługuje również aktywność naukowa doktoranta. Jest on współautorem 7 publikacji naukowych w czasopiśmie naukowym o obiegu międzynarodowym, badania wchodzące w zakres pracy doktorskiej są opublikowane w trzech pracach. Ponadto doktorant brał udział w wielu konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych prezentując na nich 5 komunikatów oraz 20 prezentacji posterowych. Jest również współautorem monografii. Doktorant był również kierownikiem 3 grantów badawczych głównym wykonawcą 1 projektu badawczego oraz wykonawcą 1 projektu badawczego. O zaangażowaniu doktoranta w badania świadczą również ukończone kursy oraz odbyte staże, tematycznie związane z badaniami wykonywanymi przez doktoranta. O randze osiągnięć doktoranta może świadczyć szereg nagród oraz stypendiów naukowych przyznawanych doktorantowi.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Radosława Sadowskiego spełnia wymagania stawione w art. 13 Ustawy o stopniach i tytułach naukowych, ponieważ zawiera oryginalne rozwiązania postawionego problemu naukowego, wskazuje na posiadanie przez autora wymaganej wiedzy teoretycznej i umiejętności jej praktycznego wykorzystania a ponadto wyniki badań zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym, przedstawione na konferencjach naukowych oraz badania te mogą mieć

zastosowanie w praktyce. Dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Radosława Sadowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie składam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr. Radosława Sadowskiego.

Uzasadnienie wniosku wyróżnienia rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska to badania zawierające elementy nowości naukowej, mające praktyczne zastosowanie. Praca jest oparta na 4 publikacjach opublikowanych w czasopiśmie o obiegu międzynarodowym o dużej renomie w środowisku naukowym. Badania doktoranta są kompleksowe. Dotyczyły one nie tylko opracowania nowych układów chromatograficznych do analizy LMWHs ale również opracowanie nowych sposobów preparatyki próbek do analizy. Każda część pracy eksperymentalnej doktoranta to nowa technika chromatograficzna – autor prezentuje układy chromatograficzne do analizy LMWHs w układach SAX, w układach RP przy zastosowaniu nowych dendrymerycznych faz stacjonarnych oraz w układach IPC-MS w każdej z prac stosując inny typ detektorów. Należy wspomnieć również, że prace doktoranta nie tylko ograniczyły się do opracowania nowych układów chromatograficznych ale również do opracowania i porównania metod preparatyki próbek. Nie sposób również pominąć pracy przeglądowej doktoranta dotyczącej metod badania LMWHs. Reasumując – praca doktorska zawiera szeroki, różnorodny a jednocześnie spójny materiał badawczy i wnosi istotne elementy nowości do dziedziny badań leków przeciwzakrzepowych. W związku z tym proszę Wysoką Radę o akceptację wniosku o wyróżnieniu pracy doktorskiej mgr Radosława Sadowskiego.



dr hab. Irena Malinowska, prof. UMCS

