



Gdańsk, 2020-09-03

Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. **RADOSŁAWA SADOWSKIEGO** zatytułowanej
„Łączone techniki chromatograficzne w analityce leków o działaniu przeciwwzkrzepowym”

Zdecydowaną większość zarejestrowanych obecnie produktów farmaceutycznych stanowią leki niskocząsteczkowe, których synteza a zwłaszcza fizykochemiczna i instrumentalna analiza nie nastrocza zwykle większych problemów. Jednak poszukiwanie nowych i skutecznych terapii chorób cywilizacyjnych prowadzi coraz częściej do proponowania jako nowe leki substancji wielkocząsteczkowych takich jak enzymy czy przeciwciała monoklonalne (biofarmaceutyki). Wg raportu firmy Whitters & Rogers z 2012 roku 60% wszystkich patentów składanych w ostatnich 3 latach przez 10 największych firm farmaceutycznych dotyczyło leków wielkocząsteczkowych. Stawia to nowe wyzwania przed farmacją i chemią związane z opracowaniem nowych optymalnych i wiarygodnych metod badania biofarmacetyków a szczególnie właściwą analizą ich tożsamości i ilości poszczególnych składników produktów leczniczych.

Oceniana praca doktorska mgr. Radosława Sadowskiego wykonana została w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem prof. UMK, dr hab. Renaty Gadzały-Kopciuch.

Przedstawiona praca jest podsumowaniem badań Autora nad charakteryzowaniem wybranych leków przeciwzakrzepowych z grupy niskocząsteczkowych heparyn (*Low Molecular Weight Heparins*, LMWHs) takich jak enoksaparyna, dalteparyna i nadroparyna z uwzględnieniem etapu przygotowania próbek oraz analiz jakościowych i ilościowych. Wyniki badań Doktoranta opublikowane zostały w serii czterech artykułów, w tym jednego o charakterze przeglądowym, w renomowanych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports* (JCR) takich jak: *Current Medicinal Chemistry*, *Journal of AOAC International*, *Analytical Methods* i *Journal of Separation Sciences* w okresie od 2017 do 2020 roku. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu wszystkich publikacji zgłaszanych jako zbiór artykułów stanowiących dysertację to $IF \sim 10$. We wszystkich czterech pracach p. Sadowski jest pierwszym autorem. Oświadczenie współautorów wszystkich publikacji również potwierdzają jednoznacznie istotną rolę oraz wiodące zaangażowanie Doktoranta w realizację badań oraz powstawanie prac. W mojej ocenie dostatecznie to dokumentuje Jego zaangażowanie w realizację badań. Uzyskane wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej były także prezentowane na licznych krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydata do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Jednocześnie, warto odnotować, że całkowity dorobek publikacyjny Doktoranta, na dzień składania rozprawy doktorskiej, to w sumie 6 prac w czasopismach z listy JCR (w pięciu z nich jest pierwszym autorem), jeden artykuł o zasięgu krajowym, cztery wystąpienia ustne, oraz liczne prezentacje plakatowe na konferencjach i sympozjach w kraju i za granicą (20). Mgr Radosław Sadowski jest także współautorem monografii wydanej przez Wydawnictwo Naukowe UMK, Toruń, w 2016 r.

Rozprawa doktorska mgr. Radosława Sadowskiego jest napisana w języku polskim i obejmuje ok. 30 stron przedstawiających w rozszerzonej wersji wprowadzenie, cel i założenia pracy jak również problemy badawcze, które w swoich badaniach Autor podejmował oraz

osobno przedstawione w zwartej formie podsumowanie i wnioski. Integralną częścią dysertacji są publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej a całość uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, oświadczenia współautorów. Do rozprawy dołączone zostały, w postaci osobnego rozdziału, pozostałe osiągnięcia naukowe Doktoranta, w tym inne niż zgłoszone w rozprawie publikacje naukowe, wymieniony został udział w konferencjach naukowych, osiągnięte stypendia oraz zaangażowanie w realizację projektów naukowo-badawczych.

Podstawowym celem pracy było opracowanie procedur analitycznych składających się z etapu przygotowania próbek oraz oznaczania jakościowego i ilościowego wybranych niskocząsteczkowych heparyn z postaci farmaceutycznych z zastosowaniem technik chromatografii jonowymiennej oraz chromatografii par jonowych sprzężonych z detekcją spektrofotometryczną (UV-VIS/DAD), detekcją laserową światła rozproszonego (ELSD) oraz spektrometrią mas (MS). Osiągnięcie powyższego celu zostało warunkowane przez zrealizowanie ośmiu zadań począwszy od tak podstawowych ale wymienionych w dysertacji jak przegląd dotychczasowych opublikowanych osiągnięć i wyników badań w obszarze tematycznym pracy, poprzez opracowania farmakopealnej (USP) oraz nowatorskiej metody analizy tożsamości badanych związków, zaproponowanie nowej, alternatywnej do farmakopealnych, fazy stacjonarnej z wypełnieniem dendrymetrycznym do oznaczania niskocząsteczkowych heparyn i następnie zvalidowanie metody, opracowanie oryginalnej metodyki przygotowania próbek z wykorzystaniem niepełnego cięcia enzymatycznego oraz odpowiednich warunków depolimeryzacji chemicznej, a także ostatecznie oznaczanie LMWHs z postaci farmaceutycznych z zastosowaniem opracowanych metod chromatografii par jonowych sprzężonych z detekcją ELSD oraz MS po zastosowaniu cięcia enzymatycznego oraz chemicznego biopolimerów heparyny.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktoranta opisanych w rozprawie oraz w załączonych publikacjach stanowiących podstawę rozprawy należą:

- opracowana nowa metodyka analityczna umożliwiła określenie profilu cukrowego niskocząsteczkowych heparyn z trzech dostępnych postaci farmaceutycznych enoksaparyny, dalteparyny i nadroparyny,

- zaproponowanie alternatywnego wypełnienia chromatograficznego (fazy dendrymerycznej) do analiz LMWHs,

- opracowana metodyka przygotowania próbek z częściowym cięciem enzymatycznym biopolimerów heparyny umożliwiła zidentyfikowanie fragmentów tetra- i heksasacharydów.

Praca doktorska mgr. Radosława Sadowskiego jest wartościowa i cenna, niemniej jednak wypada zwrócić również uwagę na te aspekty rozprawy, które wymagają dodatkowego wyjaśnienia bądź poprawienia. W podsumowaniu Doktorant wśród wniosków wymienia jako rezultat pracy doktorskiej opracowanie prostej i szybkiej metody cięcia chemicznego polimerów heparyny. Metoda ta, opublikowana zresztą w pracy oznaczonej jako D4, polega na chemicznej depolimeryzacji z użyciem kwasu azotowego(III) a następnie redukcji z borowodorkiem sodu. Mgr Sadowski nie wyjaśnia wyraźnie na czym polega Jego wkład (str. 11 wiersz 9 od dołu, str. 13 wiersz 3 od góry pracy doktorskiej) w istniejącą już i znaną od lat metodykę depolimeryzacji chemicznej heparyny. Chyba, że określenia „tańsza, prostsza i szybsza” pojawiające się w pracy doktorskiej jak i publikacji odnoszą się do metody oznaczania produktów reakcji depolimeryzacji szczegółowo opisanej w publikacji D4. Także we wnioskach, Autor odnosi się do metodyki analitycznej opartej na Farmakopei Amerykańskiej (*United States Pharmacopoeia*, USP) i jako pozycję piśmiennictwa wskazuje pracę autorstwa Yi L. *et al.* opublikowaną w *Journal of Chromatography A* w roku 2018. Czy w publikacji tej znalazło się wyraźne odniesienie do USP, i jeśli tak to do której? Czy nie lepiej byłoby wskazać w piśmiennictwie bezpośrednio odniesienie do USP co pozwoliłoby na uniknięcie dywagacji na temat zastosowanej metodyki. W tekście dysertacji w paru miejscach (m.in. na str. 83) pojawia się odniesienie do „leków testowych”. Jakże to są leki testowe i co oznaczają one w pracy doktorskiej, ponieważ w terminologii farmaceutycznej i badań klinicznych zwrot „lek

testowy” ma konkretne znaczenie i dotyczy najczęściej nowych niezarejestrowanych jeszcze leków (generycznych) dla których preparatami referencyjnymi są leki oryginalne zarejestrowane na rynku. Radziłbym unikać określenia „heparyna farmaceutyczna” pojawiającego się m.in. na str. 10 wiersz 12 i 5 od dołu. Właściwie byłoby w kontekście tego zdania określenie „heparyny jako substancji farmaceutycznej”. Brakuje mi też trochę w rozprawie porównania technik separacyjnych stosowanych do oznaczania LMWHs z ewentualnym wskazaniem zalet i wad poszczególnych z nich.

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska Pana mgr. Radosława Sadowskiego ma istotne walory oryginalności naukowej. Przygotowanie Doktoranta w zakresie analizy instrumentalnej oraz analizy fizykochemicznej, jak również umiejętne ocena uzyskanych wyników i wyważona ich interpretacja budzi uznanie. Jednocześnie, mając na uwadze ważki problem badawczy jakim zajął się w pracy mgr Sadowski, wysoki poziom naukowy mający odbicie w publikacjach stanowiących podstawę opracowania rozprawy doktorskiej, jak również uwzględniając wiodącą rolę Doktoranta w ich powstawaniu, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr. Radosława Sadowskiego do publicznej obrony tez pracy przedstawionych w dysertacji.


KIEROWNIK KATEDRY
Biofarmacji i Farmakodynamiki
prof. dr hab. Michał J. Markuszewski

