



## GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

dr hab. Danuta Siluk

Zakład Farmakodynamiki Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki

Al. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk

e-mail: [dsiluk@gumed.edu.pl](mailto:dsiluk@gumed.edu.pl), tel. 58-349-14-94

### RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej mgr. farm. Krzysztofa Goryńskiego**

**pt.: „*Application of solid-phase microextraction and quantitative structure-retention relationships as novel tools for multi-compound bioanalysis*”**

**wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Michała Marszalla, kierownika Katedry i Zakładu  
Chemii Leków Collegium Biomedicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika**

**oraz prof. Janusza Pawliszyna, kierownika Katedry Chemii Uniwersytetu w Waterloo,  
Kanada.**

Współczesne metody analityczne pozwalają na kompleksową i precyzyjną analizę związków zawartych w różnych matrycach, w tym w złożonych próbkach biologicznych. Sukces wynikający z prawidłowego oznaczania poszczególnych składników skomplikowanej matrycy biologicznej zależy od doboru odpowiednich metod przygotowania próbek, izolacji analitów oraz końcowego oznaczenia poszczególnych składników. Obecnie najczęściej wykorzystywanymi do tego celu technikami w chemii analitycznej są techniki chromatograficzne i elektromigracyjne sprzężone ze spektrometrią mas. Odpowiednia separacja analizowanych związków jak również detekcja i identyfikacja oparta o wartości masy do ładunku ( $m/z$ ) zapewniają wysoką specyficzność i czułość oraz relatywnie krótki czas opracowywanych obecnie metod analitycznych. Dodatkowo, zastosowanie wysokorozdzielczej techniki spektrometrii mas zapewnia precyzyjny pomiar masy a co za tym idzie istotnie ułatwia identyfikację poszczególnych związków wchodzących w skład złożonej próbki biologicznej. Należy także przywołać równie ważny etap w badaniach złożonych próbek jakim jest obróbka danych i metody chemometryczne, stanowiące użyteczne uzupełnienie całości badań.

Realizacja zamierzenia oznaczenia kilku, czy kilkudziesięciu związków z matrycy biologicznej nie jest zadaniem prostym, dlatego stale trwają poszukiwania bardziej efektywnych metodyk izolacji, detekcji i identyfikacji związków zawartych w różnego rodzaju próbkach. Przedstawiona do recenzji praca doktorska doskonale wpisuje się w nowoczesne zagadnienia chemii analitycznej związane z nowatorskim wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stałej w analizie próbek biologicznych. Dodatkowo, w pracy wykorzystane zostało podejście chemometryczne, w szczególności ilościowe zależności struktura-retencja (ang.: *Quantitative Structure-Retention Relationships*) do usprawnienia procesu identyfikacji składników próbek dzięki informacji płynącej ze struktury chemicznej i danych fizykochemicznych oraz czasu retencji analizowanych związków. Przedłożona dysertacja wykonana została w światowej sławy laboratorium, kierowanym przez prof. Janusza Pawliszyna, co stanowi gwarancję bardzo wysokiego poziomu przedstawionej pracy.

Praca doktorska mgr. Krzysztofa Goryńskiego ma nie tak jeszcze często spotykany u nas układ dla tego typu opracowań. Należy podkreślić, że rozprawa napisana jest w języku angielskim, z wyjątkiem streszczenia w języku polskim. Obszerna monografia zawarta jest na 155 stronach i składa się ze wstępu, celu pracy oraz kolejnych pięciu rozdziałów z opublikowanymi bądź wysłanymi do czasopism naukowych pracami. Całość zamykają wnioski końcowe, spis publikacji i doniesień zjazdowych oraz CV Doktoranta. Ponadto, opracowanie opatrzone zostało dodatkowym zeszytem z załączonym CV, spisami publikacji i doniesień zjazdowych, deklaracjami współautorów oraz załącznikiem związanym z prawami autorskimi. Na marginesie, wydaje się, że *Curriculum Vitae* i spis publikacji wystarczyłoby podać w jednej z przedstawionych pozycji.

Wstęp pracy jest świetnie przedstawionym wprowadzeniem do zagadnień poruszanych we wchodzących w skład rozprawy doktorskiej publikacjach. Z dużym zainteresowaniem przeczytałam poszczególne części wstępu, gdzie przejrzyste i w sposób możliwie zwięzły opisane zostały podstawy teoretyczne technik związanych z ekstrakcją próbek w analizie farmaceutycznej i biomedycznej. W sposób ciekawy i równocześnie zdradzający dobre przygotowanie Doktoranta opisane zostały zagadnienia związane z teorią, najnowszymi osiągnięciami oraz zastosowaniem mikroekstrakcji do fazy stałej ze szczególnym uwypukleniem aplikacji tej techniki w analizie próbek klinicznych. We wstępie umieszczony został także krótki rozdział opisujący zastosowania QSRR w nowoczesnej analizie związków.

Wstęp udokumentowany został 5 rycinami, 2 tabelami i przypisami literaturowymi w ilości 119, w znakomitej większości opublikowanymi po 2005 roku.

**Cel rozprawy** doktorskiej został dobrze określony, natomiast jego osiągnięcie udowodnione zostało w zebranych w dysertacji publikacjach.

Treści zawarte z **pierwszej pracy** włączonej do spisu rozprawy, opublikowanej w *Analytica Chimica Acta*, 750, 132-151, 2012 stanowią znakomity przegląd techniki SPME pod kątem najnowszych osiągnięć technologicznych, możliwości łączenia tej techniki z chromatografią cieczową czy gazową umożliwiające szybką analizę próbek, oraz różnorodnego jej zastosowania. Mgr Krzysztof Goryński jest autorem obszernego rozdziału opisującego nowe osiągnięcia SPME w analizie leku.

W **drugiej publikacji** porównana została metodyka SPME z metodyką ekstrakcji do fazy stałej (ang.: *solid-phase extraction, SPE*). W pracy opisane zostały różnice w tych technikach zarówno w ujęciu teoretycznym jak i eksperymentalnym. Doświadczenia oparte zostały na analizie 18 związków o polarnościach w zakresie 0,14 do 4,98 wartości logP oraz na testowaniu różnych objętości próbek przeznaczonych do ekstrakcji porównywanymi metodami. Wyniki tego interesującego porównania wskazują na SPME jako lepsze rozwiązanie w przypadku analizy niecelowanej, będącej podstawą badań metabolomicznych.

**Trzecia praca** włączona do składu rozprawy doktorskiej to manuskrypt wysłany do publikacji dokumentujący opracowanie metody HPLC/MS/MS oznaczania bromku rokuronium oraz kwasu traneksamowego izolowanych z osocza ludzkiego za pomocą SMPE. Niewątpliwym osiągnięciem pracy jest opracowanie nowatorskiej metody wskazującej na możliwość analizy 96 próbek w 35 minut, co stanowi dowód na możliwość zastosowania tego podejścia analitycznego w klinicznych badaniach przesiewowych.

Kolejna praca również zogniskowana jest na oznaczaniu wybranych związków w materiale biologicznym izolowanych za pomocą SPME. Ponadprzeciętnym osiągnięciem **czwartej pracy** włączonej w cykl publikacji stanowiących rozprawę dokorską, jest opracowanie w pełni zautomatyzowanej metody równoczesnego oznaczania 110 środków dopingowych za pomocą SPME-LC/MS/MS. Wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Analytica Chimica Acta* w 2013 r.

Ostatnia, **piąta publikacja** opisuje wykorzystanie metody ilościowych zależności struktura-retencja (QSRR) do poprawy identyfikacji leków oraz metabolitów. Opracowane

przez mgr. Krzysztofa Goryńskiego modele QSRR stanowią dowód na możliwość nowego praktycznego wykorzystania tej metodyki w analizach metabolomicznych i badaniach obecności substancji dopingowych prowadzonych przez wybrane laboratoria.

Lektura dysertacji uprawnia do stwierdzenia, że Autor wykazał się wyjątkową biegłością w opanowaniu pracy w laboratorium chemii analitycznej. Opanowanie techniki SPME oraz nietatwej techniki HPLC sprzężonej ze spektrometrem mas wysokich rozdzielczości należy uznać za główne osiągnięcia Autora podczas wykonywania powierzonych zadań w ramach pracy doktorskiej. Należy także w tym miejscu podkreślić ogromny nakład pracy, konieczny do osiągnięcia wytyczonego przez Promotorów i Doktoranta celu.

Podjęta przez p. mgr. K. Goryńskiego tematyka niewątpliwie wymagała opanowania umiejętności łączenia różnych technik analitycznych i umiejętności planowania oraz konsekwentnej realizacji założonego planu. Zebrane prace dowodzą, że Doktorant opanował te wymagania w stopniu nader zadowalającym. Przedstawione w poszczególnych manuskryptach wyniki oraz ich dyskusja potwierdzają dojrzałość Autora poprzez prezentację właściwej i równocześnie krytycznej oceny otrzymanych wyników. Praca ta dowodzi również docieklivosti Doktoranta, zrozumienia przez niego badanej materii oraz umiejętności stawiania i rozwiązywania problemów badawczych. Warto dodać, że wnioski zebrane na końcu dysertacji uwypuklają zdolność Autora do przekazania najważniejszych dokonań pracy badawczej w klarowny i przystępny sposób.

Do najważniejszych osiągnięć p. mgr. Krzysztofa Goryńskiego należy zaliczyć opracowanie nowatorskich metod oznaczania związków izolowanych z osocza krwi ludzkiej za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej oraz analizy uzyskanych ekstraktów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Podkreślić należy także nowe wykorzystanie podejścia QSRR do identyfikacji badanych związków.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej opublikowane zostały, z wyjątkiem jednej wysłanej do druku, w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, każdy o współczynniku oddziaływania powyżej 4. Jest to niewątpliwie osiągnięcie wysoko stawiające poprzeczkę naukowym rówieśnikom Doktoranta. Z uznaniem należy też dodać, że mgr K. Goryński jest współautorem 12 prac oryginalnych, 10 doniesień ustnych i 18 plakatowych na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.

Jednym z nałożonych na recenzenta obowiązków jest zwrócenie uwagi na pewne nieścisłości, które dostrzeżone zostaną w tekście pracy, a które warto poddać dyskusji. Wywiązując się z tego nader trudnego w tym przypadku obowiązku chciałam prosić o odniesienie się do następujących spostrzeżeń.

Strona redakcyjna pracy jest wykonana bardzo starannie, z obowiązku znalazłam zaledwie kilka potknięć redakcyjnych i sformułowań wartych w mojej ocenie drobnej korekty. W opisie pierwszej publikacji użyte zostało słowo „*study*” (str. 41), które wprowadza drobne nieporozumienie, gdyż przytoczona praca jest pracą przeglądową a nie eksperymentalną. Podobna nieścisłość wkradła się w opisie trzeciej pracy, gdzie ilościowe oznaczenie bromku rokunionium i kwasu traneksamowego, po wspólnej ekstrakcji w osoczu, oznaczane jest rozdzielnie z wykorzystaniem różnych kolumn chromatograficznych. Stąd użycie sformułowania „*simultaneous quantification*” może prowadzić do pochopnych wniosków (str. 70).


Pewien niedosyt budzi fakt dwukrotnego pominięcia materiałów uzupełniających (ang. *supplementary materials*) do załączonych publikacji. Szkoda, że w pracy nie zostały uwzględnione dodatkowe dane dokumentujące przebieg badań związanych z porównaniem metod SPME i SPE do izolacji związków o różnych wartościach współczynnika logP (publikacja 2) oraz do pracy opisującej zastosowanie SPME w badaniach przesiewowych środków dopingowych (publikacja 4).

W tabeli 4 na stronie 94 oraz w Tabeli 2 na stronach 131 i 132 zamieszczone zostały dane dokumentujące przebieg walidacji opracowywanych metod analitycznych. Co było przyczyną tak niewielkiej ilości próbek włączonych do badania precyzji między dniami w obu przypadkach?

Wymienione wyżej uwagi nie obniżają bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej autorstwa mgr. Krzysztofa Goryńskiego, która stanowi opracowanie wysoce wartościowe zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Należy podkreślić, że oceniana rozprawa doktorska świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu mgr. Krzysztofa Goryńskiego do prowadzenia badań naukowych. W podsumowaniu należy również podkreślić zaangażowanie i wyrazić słowa uznania dla Zespołu kierowanego przez prof. Janusza Pawliszyna. Zebrane w rozprawie doktorskiej prace są odzwierciedleniem bardzo wysokiego poziomu naukowego poszczególnych członków Zespołu.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja w pełni odpowiada warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim zawartym w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. – *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dziennik Ustaw RP nr 65, poz. 595 z dnia 16 kwietnia 2003 r.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy o dopuszczenie mgr. farm. Krzysztofa Goryńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia doktora nauk farmaceutycznych. Ponadto, z uwagi na wysoką merytoryczną wartość przedłożonej do recenzji pracy potwierdzoną wyjątkowo wysokim sumarycznym współczynnikiem oddziaływania (IF około 37,7 punktów) wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Gdańsk, 13 stycznia 2014 r.



A D I U N K T  
Zakładu Farmakodynamiki  
Katedry Biofarmacji  
i Farmakodynamiki GUMed  
*dy hab. Danuta Siluk*