

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska i Biaoanalitiky  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Toruń, dnia 5 czerwca 2022 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez  
zatytułowanej „*Opracowanie metod oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych  
z udziałem technik chromatograficznych i spektroskopowych wspartych analizą statystyczną*”

### *Ocena wyboru tematyki badawczej*

Rozprawa doktorska Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez została zrealizowana w Pracowni Badań Luminescencyjnych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. Karola Krzywińskiego, prof. UG oraz dr hab. n. med. Magdaleny Jankowskiej pełniącej funkcję promotora pomocniczego.

Tematyka poruszana w ramach niższej pracy wpisuje się w zagadnienia dotyczące poszukiwania nowatorskich rozwiązań z wykorzystaniem technik rozdzielania dla potrzeb medycznej diagnostyki w kierunku chorób przewlekłych nerek. Bardzo często w takich przypadkach niezbędna jest dializoterapia, która może prowadzić do niedoboru związków biologicznie aktywnych np. witamin z grupy B. Niezbędnym elementem staje się kontrola tych związków zarówno w pełnej krwi, jak i w dializacie z otrzewnej. Zróżnicowany materiał do badań wymaga opracowania odmiennych metodyk zarówno pozwalających na wyizolowanie danego analitu, jak i analizę uzyskanych ekstraktów. To właśnie tym zagadnieniom poświęcona jest rozprawa doktorska Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez, która miała na celu zaproponowanie procedur analitycznych umożliwiających analizę wybranych witamin rozpuszczalnych w wodzie.

### *Ocena merytoryczna rozprawy*

Przedłożona do oceny dysertacja doktorska została przedstawiona w formie klasycznej, gdzie w części eksperymentalnej Doktorant zamieścił wyniki badań nieopublikowane i te, które już ukazały się w formie artykułów naukowych (zamieszczone na końcu rozprawy oznaczone od D1 do D3). Całość stanowi zbiór informacji zamieszczonych na 110 stronach maszynopisu (bez wliczania kopii publikacji), w tym 18 rysunków i 25 tabel (4 tabele jako załączniki w Aneksie) oraz piśmiennictwo cytowane w liczbie 115 aktualnych artykułów czy monografii. Praca zawiera: streszczenie w języku polskim i angielskim wykaz stosowanych skrótów, część literaturową, cel pracy, część eksperymentalną oraz dyskusje wyników. Końcowe składowe rozprawy doktorskiej to:



wnioski, bibliografia, aneks, dorobek naukowy Doktoranta i kopie publikacji oraz zgodna komisji bioetycznej wydana w 2014 roku.

Cel pracy zdefiniowany przez Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez był podyktowany niewystarczającym stanem wiedzy w obszarze oznaczania wybranych witamin rozpuszczanych w wodzie z grupy B występujących we krwi pełnej u osób dializowanych otrzewnowo. Trzeba uznać, że cel (cele) badawcze są w dość nietypowy sposób - przeplatane wraz z wprowadzeniem, co zmniejsza ich czytelność. Szkoda, że Doktorant nie pochylił się nad sformułowaniem hipotezy badawczej

W części literaturowej Pan mgr Paweł Rudnicki-Velasquez przedstawił charakterystykę fizykochemiczną wybranych witamin z grupy B (tiamina – witamina B<sub>1</sub>; pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina – witamina B<sub>6</sub>) i antywitaminę B<sub>1</sub> (oksytiaminę) oraz ich znaczenie biologiczne. Jest to wiedza dobrze znana, ale niezbędna do omówienia zagadnień związanych z leczeniem nerkozastępczym, gdzie przedstawione zostały metody leczenia dializami - hemodializa i dializa otrzewnowa. Za cenne należy uznać przegląd literatury ukierunkowany na najnowsze osiągnięcia w zakresie wykorzystania chromatografii cieczowej z różnymi sposobami detekcji do identyfikacji wybranych analitów, które zostały opracowane w formie bardzo przejrzystej – tabela 1 i 2. W kolejnych dwóch podrozdziałach Doktorant dokonał krótkiej charakterystyki oksytiaminy i uzasadnił jej znaczenie biologiczne wraz z bardzo skromnie opracowanym opisem jej oznaczania (dwie pozycje literaturowe). Za wartościowe, z punktu widzenia omawianych później wyników, należy uznać rozdział opisujący leczenie nerkozastępcze, gdzie szczególną uwagę zwrócono na dializę otrzewnową i hemodializę oraz niekorzystne następstwa wynikające z tego sposobu leczenia. Omówiono również dość krótko najczęściej stosowany do oceny transportu przezotrzewnowego standardowy test równoważenia otrzewnowego (PET).

Część literaturową zamyka rozdział poświęcony chemiluminescencji. Nie do końca mogłam znaleźć uzasadnienie, konieczności omawiania tego zjawiska, gdyż nie było to przedmiotem tej rozprawy i nic nowego nie wnosi do dotychczasowej wiedzy na ten temat. Wystarczyło tylko przedstawić możliwości wykorzystania tej techniki do oznaczania potencjału przeciwutleniającego z wykorzystaniem zjawisk chemiluminescencji.

Podsumowując ocenę tej części rozprawy czytający odnosi wrażenie pewnego nieuporządkowania opisu przedstawianych zagadnień.

Przechodząc do najciekawszej części pracy, czyli do prezentacji wyników badań, chciałabym podkreślić jeszcze raz, że analiza treści w nich zawartych wskazuje na realizację wszystkich elementów będących założeniami pracy doktorskiej. Tą część Doktorant rozpoczął od przedstawienia materiałów i metod jakie wykorzystał do swojej pracy badawczej, a następnie przeszedł do omówienia wyników połączonych z ich dyskusją zawartą na 34 stronach. Nie do końca rozumiem, dlaczego Pan mgr Paweł Rudnicki-Velasquez wybrał dość złożoną formę przedstawienia swoich osiągnięć. Z założenia, część ta powinna być podsumowaniem przeprowadzonych badań, z których



powinno jasno wynikać jakie innowacyjne rozwiązania problemu badawczego uzyskał Doktorant. Dyskusja ta jest przeplatanką rezultatów, które już zostały opublikowane z wynikami, których nie można znaleźć w opublikowanym materiale. Niemniej jednak za wartościowe należy uznać wyniki związane z kinetyką formowania tiochromu (rozdział 4.4; publikacja D1), co niewątpliwie umożliwiono optymalizację procedury analitycznej niezbędnej do oznaczenia biologicznie aktywnej formy witaminy B<sub>1</sub>.

W kolejnych rozdziałach (4.3-4.12) Doktorant omówił wyniki związane z optymalizacją poszczególnych technik rozdzielania z różnymi sposobami detekcji, które wykorzystał w dalszych eksperymentach do analizy próbek pełnej krwi oraz dializatów z otrzewnej. Rezultaty tych badań doprowadziły Doktoranta do potwierdzenia, że zabiegi hemodializy wpływają na obniżenie zawartości difosforanu tiaminy w pełnej krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Ustalił, że stopień wypłukiwania tej aktywnej formy witaminy zależy od czynników tj.: poziom kreatyniny i hemoglobiny, liczby czerwonych krwinek, a także od rodzaju zastosowanego dializera.

Większość z przytaczanych wyników zostało opublikowane w latach 2017-2021 w czasopiśmie tematycznym, znajdujących się w bazie Journal Citation Report: Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences (2021; MEiN 70 pkt; IF=3,205), Luminescence (2019; IF=1,855; MEiN 70 pkt) oraz Blood Purification (2017; IF=1,919; MEiN 70 pkt). Nie ulega wątpliwości, że prace te przeszły rygorystyczny proces oceny recenzentkiej. Niestety, Pan mgr Paweł Rudnicki-Velasquez jest pierwszym autorem tylko w jednej z wymienionych w rozprawie publikacji [D1], drugim - w kolejnej [D2] i trzecim - w ostatniej [D3]. W żadnej nie jest korespondencyjnym autorem. Ze względu na fakt, że powyżej wymienione czasopisma nie wymagają podania, jaki był udział poszczególnych współautorów w tworzenie tych publikacji, trudno określić jaki wkład miał Doktorant w powstanie prac D1 i D2. Jedynie w odniesieniu do publikacji oznaczonej jako D3 Autor określił swój udział na stronie 83 dysertacji doktorskiej. Ponadto, ostatnia z publikacji D3 jest tematycznie niespójna z artykułami D1 i D2. Elementem łączącym tą publikację z innymi jest technika identyfikacji badanych związków oraz wybrane do badań związki (witaminy rozpuszczalne w wodzie). Praca D3 jest poświęcona witaminie C oznaczanej w suplementach, gdzie Doktorant o tematyce badawczej tego artykułu pisze: „drugim wątkiem niniejszej pracy...”.

Rozprawę doktorską kończy liczący 2 strony rozdział *Wnioski*. Jest to opis najważniejszych osiągnięć, uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Analizując tę część pracy można powiedzieć, że cel jaki postawił sobie Doktorant dysertacji został zrealizowany.

#### *Uwagi szczegółowe*

Do obowiązków recenzenta należy również wskazanie pewnych niezgodności, uwag czy też pytań, które nasunęły się podczas lektury pracy doktorskiej i pragnę polecić uwadze Doktoranta.

Proszę o wyjaśnienie:

- w jaki sposób zostały obliczone wartości granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ). Na stronie 43 mamy wzory 11 i 12, z których wynika niezaprzeczalnie, że  $LOQ=3*LOD$ . W suplemencie publikacji oznaczonej jako D1 jest natomiast zupełnie inny wzór. W tabelach 10, 12, 16-18 współczynnik 3 zastąpiony jest różnymi wartościami począwszy od 1,9 a skończywszy na 3,5,
- rozbieżności w danych zestawionych na rysunku 7A i B do tego co znalazło się w publikacji D1,
- braku opisu poszczególnych pików na chromatogramach (rysunek 10B, 11, 12), zwłaszcza gdy pików jest więcej niż oznaczanych analitów,
- oraz dodanie szczegółowego komentarza odnośnie wyników analiz uzyskane za pomocą LC-MS/MS (str. 73, rys. 14B), gdzie Doktorant stwierdza „jednoznacznie” obecność mono- i difosforanu tiaminy oraz tiochromu w próbkach dializatu z otrzewnej. Jakie było LOD i LOQ dla tej techniki?
- czy wyniki w rozdziale 4.11 uzyskano na podstawie LC-MS/MS?
- w jaki sposób określana była selektywność poszczególnych technik oznaczania badanych związków?

Ogólnie ujmując, praca jest przygotowana starannie od strony edytorskiej, zawiera jedynie nieliczne błędy literowe. Jednak Doktorant używa sformułowań, które według mojej wiedzy nie są zbyt trafne i nie znajdują odzwierciedlenia w nomenklaturze i terminologii chemicznej, np. „w stanie chemicznie czystym” (str. 3), „kolumny n-oktadecylowe” (str. 15), „detektorem masowym (MS)” (str. 22), „analitów biologicznych”, „związków biologicznych” (str. 36), „analizy tandemowe”, „stacjonarne widma fluorescencji” (str. 38) „rozdział” w odniesieniu do rozdzielania chromatograficznego (cała praca), zamiennego stosowania „metoda” zamiast technika do określenia chromatografii cieczowej, „żelazycyjanek(III) potasu” (str. 39) zamiast heksacyjanożelazian(III) potasu lub żelazycyjanek potasu bez wskazania wartościowości żelaza, „kalibrator” (str. 48), „klasyczne LC oraz HPLC” (str. 75), itp.

Podsumowując swoją recenzję stwierdzam, że cel pracy został zrealizowany, a otrzymane wyniki są pozytywne i istotne naukowo. Trochę ubolewam nad zbyt opisowymi wnioskami końcowymi.

Do najważniejszych osiągnięć omawianej rozprawy doktorskiej zaliczam:

- wybór interesującej naukowo tematyki badawczej,
- opracowanie metodyki oznaczania wybranych witamin rozpuszczalnych w wodzie z możliwością ich potencjalnego zastosowania w analityce biomedycznej,
- wykorzystanie chemometrii i analizy statystycznej niezbędnej do poszukiwania korelacji pomiędzy otrzymanymi wynikami badań a parametrami klinicznymi (Suplement do artykułu, który ukazał się w *Journal of Chromatography B*, 2021),



- innowacyjne rozwiązanie do badań właściwości przeciwutleniających kwasu askorbinowego oparte na pomiarze zmian parametrów emisji – wykorzystanie soli akrydyniowych o właściwościach chemiluminogennych.

Miarą naukową wartości przedstawionej mi do oceny dysertacji jest to, że rezultaty badań naukowych przeprowadzonych w ramach tej pracy zostały już częściowo opublikowane. Całkowity dorobek naukowy Doktoranta stanowi 6 publikacji z listy JCR (tylko w 2 z nich Pan mgr Paweł Rudnicki-Velasquez jest pierwszym autorem) oraz 13 prac spoza listy Ministerstwa Edukacji i Nauki. Dodatkowo podczas realizacji pracy doktorskiej Doktorant aktywnie prezentował wyniki swoich badań na konferencjach krajowych w postaci komunikatów (13) oraz prezentacji plakatowych (15). Doktorant brał także udział w stażach krajowych oraz był wykonawcą zadań badawczych w ramach projektów finansowanych z Narodowego Centrum Nauki.

#### *Wniosek końcowy*

Oceniając zawartość przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pan mgr Paweł Rudnicki-Velasquez w sposób wystarczająco jednoznaczny sformułował oryginalny problem naukowy, który rozwiązał przy użyciu dostępnych metod naukowych. W moim przekonaniu główny cel rozprawy był konsekwentnie realizowany i został osiągnięty, a Doktorant wykazał się odpowiednim opanowaniem wiedzy teoretycznej i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Za wartościowe osiągnięcie, z punktu widzenia aplikacyjności, można uznać wykorzystanie metod instrumentalnych (głównie technik rozdzielania) w medycznych badaniach diagnostycznych. Recenzowana rozprawa reprezentuje dobry poziom naukowy, zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają mojej pozytywnej oceny recenzowanej pracy.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez nt. *Opracowanie metod oznaczania wybranych związków biologicznie aktywnych z udziałem technik chromatograficznych i spektroskopowych wspartych analizą statystyczną* spełnia warunki stawiane pracom doktorskim zawarte w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgra Pawła Rudnickiego-Velasquez do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Łucja Gąsior-Kopciuch*