



UMCS

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Chemii

dr hab. Irena Choma, prof. UMCS
Katedra Metod Chromatograficznych
pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin

Lublin, 20.05.2021

**RECENZJA DOTYCZĄCA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO,
DOROBKU NAUKOWEGO ORAZ DZIAŁALNOŚCI ORGANIZACYJNEJ I DYDAKTYCZNEJ
DR. NAUK FARMACEUTYCZNYCH ANNY KLIMEK - TUREK
UBIEGAJĄCEJ SIĘ O NADANIE STOPNIA DOKTORA HABILITOWANEGO W DZIEDZINIE NAUK
MEDYCZNYCH I NAUK O ZDROWIU W DYSCYPLINIE NAUK FARMACEUTYCZNYCH**

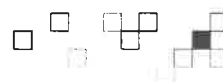
Opinię przygotowałam na podstawie dokumentów Wnioskodawcy przesłanych przez prof. dr. hab. Dariusza Matosiuka, przewodniczącego Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. Dokumentacja zawierała m.in. autoreferat dr Anny Klimek-Turek obejmujący opis osiągnięcia naukowego oraz informacje o aktywności naukowej, działalności dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej, wykaz osiągnięć naukowych, wykaz opublikowanych prac, kopie publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, oświadczenia współautorów.

OCENA OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO – MONOTEMATYCZNEGO CYKLU PUBLIKACJI

Pani Anna Klimek-Turek związana jest naukowo z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie, na którym w 2005 r. uzyskała tytuł magistra a w 2010 r. obroniła rozprawę doktorską pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Dzido. W 2010 r. została zatrudniona w Zakładzie Chemii Fizycznej UM, początkowo na etacie asystenta a następnie adiunkta.

Osiągnięcie zatytułowane:

Ekstrakcja substancji oznaczanych z miejsca frontu rozpuszczalnika na warstwie adsorbentu jako nowy sposób przygotowania próbek o skomplikowanej matrycy do analizy ilościowej technikami instrumentalnymi



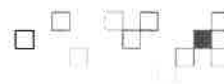
zostało przedstawione jako cykl sześciu powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2016-2020 i oznaczonych jako H1-H6. Trzy z nich ukazały się w *J. Chromatogr. A* (doi:10.1016/j.chroma.2016.01.053, doi:10.1016/j.chroma.2017.11.042, doi:10.1016/j.chroma.2020.460912), pozostałe w *J. Planar Chromatogr.* (doi:10.1556/1006.2019.32.3.2), *Molecules* (doi:10.3390/molecules24071358) i *Scientific Reports* (doi:10.1038/s41598-020-71846-6). Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania IF tych czasopism wynosi 19,826.

Artykuły należące do cyklu habilitacyjnego są wieloautorskie (od 3 do 6 autorów), w których Habilitantka pełni rolę autora korespondującego. Co istotne, z oświadczeń współautorów wynika, że Jej udział był kluczowy w powstaniu w/w prac – polegał na zdefiniowaniu koncepcji, zaplanowaniu eksperymentu, opracowaniu wyników i zredagowaniu manuskryptu. W związku z powyższym nie ulega wątpliwości, że przedstawione we Wniosku prace są indywidualnym osiągnięciem dr A. Klimek –Turek i mogą stanowić podstawę postępowania habilitacyjnego zgodnie w wymogami art. 219 ust. 1 pkt.2b) i ust. 2 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2020 poz. 85 z późn. zm.).

Tematyka badań omawianego cyklu jest bardzo spójna. Dotyczy aspektów teoretycznych i praktycznych innowacyjnej techniki przygotowania próbek biologicznych, w której wykorzystywana jest ekstrakcja cieczo-ciało stałe z pozycji frontu rozpuszczalnika na warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej (ang. Solvent Front Position Extraction, SFPE). Technika ta w założeniu umożliwia instrumentalną analizę ilościową.

Przeprowadzone badania można podzielić na pięć etapów:

1. Przyjęcie założeń teoretycznych i ich weryfikacja [H1]
2. Badania nad możliwością zastosowania procedury SFPE do przygotowania testowych próbek biologicznych w celu ilościowego oznaczania zawartych w nich substancji [H1 - H3].
3. Optymalizacja warunków prowadzenia procedury SFPE [H1 – H6].
4. Próby częściowej automatyzacji procedury SFPE [H4 - H5].
5. Zastosowanie procedury SFPE, jako techniki przygotowania próbki, do oznaczania substancji biologicznie czynnej (tryptofanu) w próbkach klinicznych [H6].

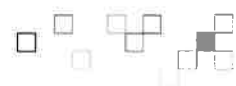


Omówienie osiągnięcia, o którym mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2b) i ust. 2 Ustawy, poprzedzone jest w autoreferacie wprowadzeniem dotyczącym oznaczania substancji biologicznie aktywnych w matrycach biologicznych a zwłaszcza etapowi przygotowania próbek, który często jest niedoceniany a zajmuje ok. 3/4 całkowitego czasu analizy i decyduje o wiarygodności wyników. Obecne trendy dotyczące procedury przygotowania próbek to skrócenie czasu, uproszczenie metodyki, obniżenie kosztów, zwiększenie selektywności wydzielania analitu, poprawa dokładności i precyzji oznaczeń, obniżenie granice wykrywalności i oznaczalności. Ważny jest też aspekt ekologiczny, możliwość automatyzacji i pracy on-line z urządzeniem do analizy instrumentalnej.

Autorka omawia najczęściej stosowane metody przygotowania próbek biologicznych (takich jak krew i osocze) tj.: strącanie białka (PP, protein precipitation), ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE, liquid-liquid extraction), mikroakstrakcję oraz ekstrakcję do fazy stałej (SPE, solid phase extraction), QuEChERS (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) wykazując ich zalety i ograniczenia. Habilitantka wymienia również mniej popularną ale istotną z punktu widzenia badań przesiewowych metodę analizy suchej kropli krwi (DBS, dried blood spot).

Trochę szerzej omówiona jest nietypowa technika przygotowania próbek z pomocą dwukierunkowej chromatografii planarnej, zaprezentowana przez Oellig i Schwack'a (High-throughput Planar Solid Phase Extraction – HTpSPE). Podstawy teoretyczne HTpSPE zainspirowały Autorkę do opracowania własnej techniki przygotowania próbek za pomocą jednokierunkowej chromatografii planarnej tj. ekstrakcji z miejsca frontu rozpuszczalnika, w której

1. Roztwór próbki ze standardem wewnętrznym nanosi się na płytkę chromatograficzną.
2. Poprzez kilkukrotne rozwijanie chromatogramu doprowadza się substancje oznaczane i standard wewnętrzny do wspólnej strefy na płycie chromatograficznej oddzielonej od składników matrycy o innej retencji. Wspólna strefa znajduje się w pozycji frontu rozpuszczalnika po ostatnim etapie rozwijania chromatogramu.
3. Wspólną strefę zawierającą składniki próbki i wzorzec wewnętrzny ekstrahuje się przy użyciu przystawki TLC-MS Interface i poddaje analizie instrumentalnej. Można też zeszkrobać adsorbent z miejsca pozycji frontu rozpuszczalnika, umieścić na sączku i wyciągnąć anality odpowiednim rozpuszczalnikiem do fiolek.



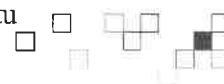
Pierwszy etap badań przeprowadzono dla pojedynczej substancji (paracetamolu) w metanolu a następnie matrycy biologicznej w postaci surowicy wołowej przy użyciu wzorca wewnętrznego – acetanilidu i stosując metanol jako ekstrahent. Roztwory po ekstrakcji poddawano analizie HPLC, a następnie wyznaczano stosunek pola powierzchni paracetamolu do acetanilidu dla każdej próbki. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami HPLC uzyskanymi dla próbek nie poddanych procedurze SFPE. Względne odchylenie standardowe, RSD, oraz błąd względny nie przekroczyły 5%, niezależnie czy oznaczane substancje były ekstrahowane z fragmentu, czy z całej strefy substancji.

W kolejnym etapie badań procedurę SFPE zastosowano do oznaczania paracetamolu w matrycy biologicznej (surowica wołowa) fortyfikowanej preparatem złożonym Migrastop zawierającym, oprócz paracetamolu, kwas acetylosalicylowy oraz kofeinę. Wyniki oznaczenia ilościowego paracetamolu, w tak przygotowanej próbce, były bardzo dobre, wartości błędu względnego oraz RSD nie przekroczyły 3%.

Następnie do testów użyto próbkę wieloskładnikową, w skład której weszło 8 różniących się właściwościami fizykochemicznymi substancji (paracetamol, kofeina, teofilina, kwas acetylosalicylowy, tramadol, aminofenazon, ciprofloksacyna i acebutolol) oraz acetanilid jako standard wewnętrzny. W tym wypadku konieczne okazało się zawężanie stref substancji po naniesieniu na płytkę a przed właściwą procedurą rozwijania. Dzięki temu zabiegowi możliwe było zniwelowanie skutków czołowej chromatografii krążkowej w momencie aplikacji. Zasadność stosowania procedury zawężania stref substancji przed właściwym rozwijaniem zweryfikowano również na przykładzie innej grupy substancji – kokcydiostatyków.

Konieczność wykonania dużej ilości operacji manualnych zachęciły Autorkę do zastosowania, z bardzo dobrym skutkiem, prototypowego urządzenia z ruchomą pipetą umożliwiającą dostarczanie fazy ruchomej w dowolne miejsce na płytce chromatograficznej i rozwijanie chromatogramów w dowolnym kierunku. Dzięki temu rozwiązaniu procedura SFPE stała się półautomatyczna.

W następnym etapie przeprowadzono badania retencji substancji w różnych układach chromatograficznych testując różne fazy stacjonarne: adsorbenty tlenek glinu i żel krzemionkowy i żel krzemionkowy modyfikowany grupami C18, cyjanowymi, aminowymi oraz diolowymi z metanolem jako fazą ruchomą. Następnie dla wybranych faz stacjonarnych przeprowadzono badania zależności retencji substancji od składu użytego eluentu



tj. mieszaniny metanolu (różne stężenia) z buforami w zakresie pH 3,0 - 10,0. Stosowano też procedurę z gradientem skokowym stężenia fazy ruchomej.

W ostatnim etapie badań zastosowano procedurę SFPE do oznaczania tryptofanu w osoczu. Próbkę krwi pozyskano od pacjentów we współpracy z laboratorium klinicznym Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 4 w Lublinie. Jako standard wewnętrzny zastosowano znakowany L-tryptofan. Na płytce SiO₂-Diol (10x10) naniesiono 12 próbek osocza. Faza ruchoma była dostarczana automatyczną pipetą. W pierwszym rozwinięciu wymyto substancję oznaczaną i standard wewnętrzny poza strefę startową, w drugim oddzielono od składników matrycy o mniejszej retencji od analitu i wzorca. W kolejnym rozwinięciu strefy tryptofanu oraz standardu wewnętrznego sprowadzono do wspólnego miejsca na froncie rozpuszczalnika skąd zostały wyekstrahowane przy użyciu przystawki TLC-MS Interface. Zastosowano wariant off-line (zbieranie roztworu do fiolek) lub online polegający na bezpośrednim wprowadzaniu ekstraktu z przystawki do spektrometru mas. Jako procedurę odniesienia, w procesie przygotowania próbki, zastosowano precypitację białek i następnie oznaczenie techniką LC-MS/MS. Wyniki uzyskane w ten sposób traktowano jako referencyjne w stosunku do uzyskanych przy zastosowaniu procedury SFPE. Zarówno wartości błędu względnego, jak i RSD nie przekraczały 5%. Porównywalne były też wartości LOD i LOQ. Dodatkowo próbka przygotowana techniką SFPE była wolna od większości składników matrycy, co w przypadku analizy MS oznacza brak tzw. efektu matrycy.

Wyniki badań będące przedmiotem osiągnięcia naukowego, opisane w pracach tworzących jednotematyczny cykl publikacji, zostały podsumowane przez Habilitantkę w autoreferacie. Z podsumowaniem tym całkowicie się zgadzam i poniżej przedstawiam je w pewnym skrócie:

1. Zastosowanie procedury SFPE pozwala na otrzymanie parametrów walidacyjnych porównywalnych do tych uzyskiwanych we współczesnej analizie instrumentalnej. Poprzez dobranie odpowiedniego układu chromatograficznego, możliwe jest przygotowanie wieloskładnikowych próbek zawierających związki o różnej budowie i właściwościach fizykochemicznych.
2. Częściowe zautomatyzowanie procedury SFPE zmniejsza liczbę operacji manualnych, skraca czas analizy i zmniejsza zużycie rozpuszczalników.
3. Technika SFPE umożliwia bardzo dobre oczyszczenie od składników matrycy.



4. Próbkę przygotowane techniką SFPE mogą być bezpośrednio wprowadzane do spektrometru mas, z pominięciem ich rozdzielania innymi technikami chromatografii ciekłowej, np. HPLC.
5. Dokładne i precyzyjne wyniki oznaczenia tryptofanu w próbkach osocza ludzkiego, przygotowanych procedurą SFPE, potwierdzają, że technika ta może być stosowana w celu przygotowania próbek klinicznych do oznaczania substancji biologicznie aktywnych.

Tematyka przedstawiona w sześciu publikacjach cyklu zawiera istotne elementy nowości naukowej. Eksperyment został zaplanowany precyzyjnie i logicznie, kolejne etapy doświadczeń opierały się na wnioskach wynikających z poprzednich, prowadząc do opracowania nowej i konkurencyjnej w stosunku do obecnie stosowanych metody przygotowania próbek. Udowodniono, że chromatografia cienkowarstwowa może być z powodzeniem wykorzystana w celu przygotowania próbek biologicznych do analizy ilościowej technikami instrumentalnymi.

Podsumowując, osiągnięcie naukowe Habilitantki, dotyczące nowatorskiej techniki SFPE, może stanowić podstawę nadania stopnia doktora habilitowanego w dyscyplinie nauk farmaceutycznych.

OCENA DOROBKU NAUKOWEGO ORAZ OSIĄGNIĘĆ ORGANIZACYJNYCH I DYDAKTYCZNYCH

Całkowity dorobek naukowy dr Anny Klimek-Turek po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje 24 prace naukowe opublikowane w czasopismach z listy JCR (włączając sześć prac cyklu habilitacyjnego) o sumarycznym IF 51,085. Łączna wartość IF uwzględniająca dwie prace opublikowane przed doktoratem to 52,491, indeks Hirscha 7, liczba cytowani 109 (wg Web of Science), 129 (wg Scopus). Na tym etapie rozwoju naukowego są to wartości zadowalające.

Wyniki badań były też prezentowane w formie 32 doniesień zjazdowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, podczas których Habilitantka była autorem lub współautorem wykładów plenarnych i wystąpień ustnych.

Działalność naukowo-badawcza prowadzona po obronie pracy doktorskiej koncentrowała się na następujących zagadnieniach:



1. Opracowaniu procedury przygotowania próbek biologicznych do oznaczania substancji biologicznie aktywnych metodami instrumentalnymi.
2. Badaniu wpływu modyfikatora eluentu na selektywność rozdzielania substancji w układach z różnymi modyfikatorami
3. Elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej.

W dokumentacji nie ma informacji o odbyciu przez dr A. Klimek-Turek zagranicznego stażu naukowego. Nie oznacza to jednak braku aktywności Habilitantki na polu współpracy międzynarodowej, o czym świadczy współpraca z prof. Heinzem Engelhardtem z Uniwersytetu w Saarland w Niemczech (efektem jest publikacja: Zał. 3, II.4 poz.2). Liczne są za to dowody aktywności na innych polach. Habilitantka brała udział jako wykonawca w realizacji grantów NCN (projekt badawczy własny 2011-2014 i Opus 12 2017-2021) i NCBR. Ten ostatni, Tango2/341314/NCBR/2017, jest jeszcze w realizacji. Prowadzi też, jako kierownik, projekt wewnętrzny UM – MNh 36. Bogata jest także współpraca z podmiotami krajowymi (uczelniami, laboratoriami, szpitalami, urzędami), która zaowocowała aż siedmioma publikacjami. Habilitantka nawiązała także współpracę z podmiotem gospodarczym, tj. Przedsiębiorstwem Handlowym „Krautex”; jest też autorem ekspertyzy wykonanej dla firmy DROPMAX LTD.

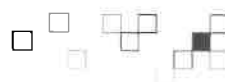
Dr Anna Klimek-Turek była także członkiem komitetów organizacyjnych dwóch konferencji krajowych.

Habilitantka odbyła liczne szkolenia dotyczące głównie metod spektroskopowych podnosząc stale swoje kwalifikacje zawodowe. Została nagrodzona Zespołową Nagrodą Naukową Ministra Zdrowia 2009, oraz pięciokrotnie Indywidualnymi Nagrodami Rektora UM III st.

Dr Anna Klimek-Turek jest współautorką trzech międzynarodowych patentów.

Habilitantka prowadzi od 2006 r. ćwiczenia a od 2012 r. również wykłady z chemii fizycznej dla studentów Farmacji, Analityki Medycznej i Kosmetologii oraz wykładów i ćwiczeń w języku angielskim dla studentów Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Anglojęzycznym z przedmiotu General and Analytical Chemistry (od 2012r.). Była promotorem 13 prac magisterskich oraz promotorem pomocniczym w 2 pracach doktorskich

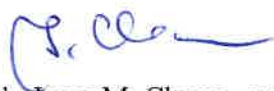
W latach 2006 – 2010 prowadziła kursy HPLC na Wydziale farmacji UM a w 2016 warsztaty „Technika HPLC, możliwości chromatografii cieczowej” w ramach IV Ogólnopolskiej Konferencji Lubelskiego Towarzystwa Studentów Analityki Medycznej.



PODSUMOWANIE

Osiągnięcie naukowe dr Anny Klimek-Turek spełnia kryteria art. 219 ust. 1 pkt. 2b) oraz ust. 2 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2020 poz. 85 z późn. zm.) a zgromadzony przez nią dorobek naukowy stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauk farmaceutycznych. Habilitantka jest doświadczoną badaczką, która potrafi samodzielnie sformułować problem badawczy, stworzyć koncepcję badań, zaproponować ich plan, zrealizować go i opublikować wyniki. Habilitantka realizuje projekty w ramach ogólnopolskich konkursów grantowych. Osiągnięcia organizacyjne, popularyzatorskie i dydaktyczne pozwalają wnioskować, że dr Anna Klimek-Turek jest dobrze przygotowana do samodzielnej pracy badawczej.

Habilitantka spełnia wymogi stawiane ustawowo i zwyczajowo kandydatom ubiegającym się o stopień doktora habilitowanego. Wniosuję o nadanie dr Annie Klimek-Turek stopnia doktora habilitowanego w dyscyplinie nauk farmaceutycznych i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.



Dr hab. Irena M. Choma, prof. UMCS

