UNIWERSYTET GDAŃSKI

IN MARI VIA TUA

CHEMIA UG

Prof. dr hab.
PIOTR STEPNOWSKI

Gdańsk, dnia 6 marca 2018 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Oliwii Szerkus pod tytułem „Oznaczanie wybranych substancji farmaceutycznych w materiale biologicznym z zastosowaniem technik UHPLC-DAD i HPLC-MS/MS i wykorzystaniem metod planowania doświadczeń (DoE)"

Szybki i niskokosztowy proces doboru najlepszych warunków oznaczeń instrumentalnych, optymalizacja procedur analitycznych oraz ich pełna i wiarygodna walidacja przedstawiają jedne z najpoważniejszych wyzwań współczesnej analityki i bioanalityki farmaceutycznej w badaniach farmakokinetycznych czy metabolomicznych. Nieocenione w tym zakresie stały się w ostatnich kilku latach zaawansowane narzędzia statystyczne umożliwiające w zaledwie kilku krokach dobór optymalnych zmiennych procesu czy wybór najlepszych parametrów oznaczeń końcowych jak i modelowanie i analizę uzyskiwanych danych pomiarowych. Jednym z praktycznych podejść w tym zakresie jest szerokie spektrum metod tzw. planowania eksperymentów DoE (*ang.* Design of Experiments), które można stosować na różnych etapach procesu analitycznego, tj. przygotowania próbek do analiz, badań przesiewowych, doboru warunków ekstrakcji, doboru warunków rozdzieleń chromatograficznych, ocenie elastyczności procedur czy optymalizacji parametrów detekcji.

Tematem rozprawy doktorskiej mgr Oliwii Szerkus było zastosowanie zaawansowanych metod planowania doświadczeń w badaniach nad opracowaniem procedur analitycznych oznaczania lewofloksacyny, cyprofloksacyny, deksmedetomidyny, cyklosporyny, 7-metyloguaniny, kwasu glukuronowego oraz innych związków w różnych próbkach biologicznych. Badania analityczne prowadzono z wykorzystaniem technik wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzęgniętych z tandemową spektrometrią mas lub spektrometrem z matrycą fotodiodową. Z kolei w planowaniu eksperymentów wykorzystano plany ułamkowe, kompozycyjne, Plackett-Burmana oraz Box Behnkena. Praca została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Michała Markuszewskiego z Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Jest to jeden z wiodących zespołów badawczych w zakresie nowoczesnych badań biofarmaceutycznych opartych o techniki rozdzielcze wspomagane narzędziami statystycznymi stąd Kandydatka mogła rozpocząć swoje zadania badawcze na podstawie mocno ugruntowanych tez, których podstawy eksperymentalne wypracowano przez lata we wcześniejszych badaniach Katedry. Niezależnie od tego, należy uznać, iż wybrana przez Kandydatkę tematyka pracy doktorskiej jest nie tylko bardzo interesująca z utylitarnego punktu widzenia, ale i wnosi znaczący wkład w poznanie podstawowych zagadnień, zarówno na różnych etapach procesu analitycznego jak i w obrębie interpretacji wyników badań.

Pracę rozpoczyna krótki wstęp i część teoretyczna, która niemal w całości poświęcona została metodykom planowania oraz rodzajom stosowanych planów doświadczeń. Lektura tej nieźle napisanej części pracy pozostawia lekki niedosyt w zakresie najciekawszego, z punktu widzenia dysertacji, zagadnienia zastosowania DoE w badaniach bioanalitycznych. Nie mam wątpliwości, co do liczby i aktualności przytoczonych tam doniesień naukowych w tym zakresie. Uważam jednak, że powinny one zostać poddane znacznie głębszej analizie, wzajemnym porównaniom czy wykazaniem

Otrzymano 16.03.18 r.

WYDZIAŁ CHEMII Katedra Analizy Środowiska
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
tel. +48 523 52 05, email: piotr.stepnowski@ug.edu.pl

słabych i mocnych stron z punktu widzenia ich przydatności w optymalizacji procedur. Znacząco pomogłoby to w ocenie badań własnych doktorantki.

Część doświadczalną dysertacji przedstawiono na podstawie pięciu opublikowanych artykułów oryginalnych i jednej pracy przeglądowej. Do pracy dołączono oświadczenia współautorów, z których wynika, że we wszystkich pracach udział kandydatki był wiodący zarówno w zakresie koncepcji badań, planowania i wykonania prac eksperymentalnych, wykonaniu obliczeń statystycznych, jak i interpretacji i dyskusji wyników. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych periodykach naukowych takich jak *Journal of Chromatography* B (IF=2,6), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF=3,2) czy *Bioanalysis* (IF=2,6). Prace te przeszły już rygorystyczny proces wydawniczy, w którym zaangażowano przynajmniej dwóch zewnętrznych recenzentów, stąd ocena tych osiągnięć jest poniekąd ułatwiona.

Większość z uzyskanych przez doktorantkę wyników oceniam bardzo wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia kandydatki uważam:

- Wykazanie przydatności zastosowanych planów DoE do rozpoznania zmiennych wpływających na proces przygotowania próbek i jakość oznaczeń analitycznych lewofloksacyny i cyprofloksacyny w tkance ludzkiej prostaty i osoczu z zastosowaniem technik UHPLC-DAD oraz LC-MS/MS, a także dowiedzenie informatywności analitycznej wygenerowanych wykresów powierzchni odpowiedzi i wykresów kwantylowych. Na uznanie zasługuje również fakt, zastosowania opracowanej metody do analizy próbek biologicznych pochodzących od 140 Pacjentów Kliniki Urologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.
- Pomyślne zastosowanie centralnego planu kompozycyjnego do optymalizacji pracy źródła jonów ESI wykorzystywanego w metodach ilościowego oznaczania deksmedetomidyny w próbkach osocza czy 7-metyloguaniny i kwasu glukuronowego w moczu z użyciem techniki LC-ESI-MS/MS, a także wykorzystanie planu Plackett-Burmana do oceny elastyczności metod. Potwierdzono przy tym stabilność opracowanej metody oznaczania deksmedetomidyny w oznaczeniach ponad 600 próbek rzeczywistych, które stały się podstawą oceny farmakokinetycznej populacji pacjentów pediatrycznych z oddziałów intensywnej terapii.
- Opracowanie metody oznaczania ilościowego cyklosporyny A w tkankach płynnych oka królików z użyciem techniki UHPLC-DAD oraz ocena jej elastyczności poprzez parametryzowanie temperatury kolumny, udział modyfikatora w fazie, długość fali analitycznej oraz natężenia przepływu fazy wykorzystując odpowiednie plany doświadczeń.

Z kolei poniżej wymieniam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- Jednym z celów pierwszej pracy cyklu było zastosowanie planu Box-Behenkena do optymalizacji warunków elucji izokratycznej lewofloksacyny i cyprofloksacyny dla uzyskania pożądanego czasu retencji analitów, zadowalającej symetrii sygnałów oraz odpowiedniej rozdzielczości. Zarówno w samym artykule jak i poprzedzającym go opisie nie sformułowano jednak jasno problemu analitycznego związanego z rozdzieleniem tych dwu związków, ani też strategii jego rozwiązania. Nie skonfrontowano także uzyskanych w badaniach parametrów chromatograficznych z tymi już przedstawionymi w literaturze (np. Liang i in. 2002). W związku z tym ocena korzyści wynikających z zastosowania ww planu, a następnie funkcji użyteczności jest utrudniona. Niewątpliwym osiągnięciem jest tu optymalizacja metody ekstrakcji lewofloksacyny z próbek osocza i tkanek gruczołu prostaty z zastosowaniem metody planowania doświadczeń. Jednakże nie jest jasne dlaczego do oceny wpływu wybranych czynników wykorzystano stosunek powierzchni sygnałów lewofloksacyny i cyprofloksacyny (wzorzec wewnętrzny), a nie wartość efektywności ekstrakcji czy odzysku bezwzględnego?
- W kolejnej pracy cyklu przedstawiono wyniki badań oznaczania lewofloksacyny i cyprofloksacyny w próbkach tkanek ludzkiej prostaty. W ramach badań przeprowadzono szereg eksperymentów optymalizacyjnych w oparciu o ułamkowy plan czynnikowy w celu oceny wpływu

najważniejszych parametrów (czas i temperatura ekstrakcji, objętość metanolu użyta do homogenizacji próbki, czas homogenizacji) na wydajność ekstrakcji obu substancji. Czy podjęcie optymalizacji tych parametrów ponownie było uzasadnione, skoro wpływ trzech z nich (objętość metanolu użyta do homogenizacji próbki, czas i temperatura ekstrakcji), był już określony i zdefiniowany jako istotny w pierwszym artykule cyklu? W niniejszej pracy dokonano również badanie elastyczności metody analitycznej z uwzględnieniem wpływu wybranych parametrów pracy chromatografu i spektrometru mas. Nie wiadomo jednak na jakiej podstawie dokonano wyboru zakresu badanych parametrów przedstawionych w Tabeli 1 (str. 60 pracy doktorskiej)

- W artykule nt. metody oznaczania deksmedetomidyny w próbkach osocza przetestowano dwie kolumny analityczne wypełnione fazą C18, ale o różnych rozmiarach. Do dalszych badań wybrano kolumnę Zorbax Eclipse Plus, jako powód podając, cyt. „obniżenie tłumienia jonu". W pracy nie podano jednak żadnych danych własnych czy literaturowych potwierdzających ten wniosek. Czy doktorantka mogłaby podać prawdopodobny mechanizm wzmocnienia/tłumienia sygnałów w LC-MS w związku z wpływem rodzaju kolumny na obniżenie/zwiększenie efektów matrycowych. Jestem również ciekaw, w jaki sposób dokonano wyboru zakresu badanych parametrów przedstawionych w podrozdziale pt. Experimental design approach (str. 77).
- W optymalizacji parametrów pracy źródła jonów z zastosowaniem kilkuetapowej strategii optymalizacyjnej do oznaczania kilkunastu związków obecnych w ludzkim moczu przedstawiono szczegółowy opis prac zakończonych wyborem najbardziej korzystnej kombinacji tych parametrów. W pracy nie znalazłem jednak informacji nt. kryterium wyboru badanych analitów. Nie znalazłem także parametrów walidacyjnych opracowanej metodyki oraz wielkości efektów matrycowych. Opracowana metoda została zastosowana do analizy próbki moczu, jednakże w publikacji nie podano sposobu przygotowania tej próbki do analizy. Ponadto w pracy napisano (str. 84), iż opracowane ustawienia pracy źródła jonów zastosowano do analizy próbek moczu 40 pacjentów zdrowych oraz 40 pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem pęcherza moczowego, jednakże wyniki ww porównania analiz nie zostały przedstawione.
- w żadnej z przedstawionych w ramach pracy doktorskiej publikacji nie dołączono materiałów uzupełniających (Supplement) co nieco utrudnia interpretację uzyskanych w ramach tych prac wyników.
- W pracy znalazło się kilka niezręczności językowych, np. zamiennie używanie terminów oznaczanie i analiza, tryb monitorowania reakcji następczych (powinno być monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji), napięcie na kapilarze (powinno być napięcie przyłożone do kapilary) czy zawartość procentowa metanolu na początku gradientu fazy ruchomej (powinno być zawartość procentowa metanolu w fazie ruchomej na początku programu elucji gradientowej).

Przytoczone wątpliwości nie maja istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany, a postawione przez autorkę tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr Oliwii Szerkus zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał badawczy, a Kandydatka wykazała się ponadto doskonałą znajomością technik laboratoryjnych w zakresie analityki chromatograficznej materiału biologicznego oraz metod DoE.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Oliwii Szerkus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na względzie zakres wykonanych prac oraz dotychczasową aktywność naukową doktorantki zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Piotr Stefański