



Prof. dr hab. Michał Ciborowski
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Centrum Badań Klinicznych
Laboratorium Metabolomiki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Olgi Maliszewskiej pt.:

*„Optymalizacja metod chromatograficznych jako narzędzi analitycznych do pomiaru stężeń
wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym”*

wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem dr hab. Aliny Plenis.

W ocenianej rozprawie doktorskiej przedstawione zostały badania poświęcone optymalizacji metod analitycznych do oznaczania stężeń wybranych leków cytostatycznych w materiale biologicznym wraz z ich zastosowaniem do analizy próbek klinicznych i potencjalnym wykorzystaniem w terapii monitorowanej stężeniem leku. Cytostatyki charakteryzują się wąskim zakresem terapeutycznym, zatem monitorowanie ich stężenia w organizmie w trakcie terapii pomaga utrzymać je we wskazanym przedziale, co pozwala na optymalizację efektu terapeutycznego i ograniczenie potencjalnych efektów ubocznych. Niezbędnym elementem takiej terapii są odpowiednie metody analityczne pozwalające na pomiar stężenia danego leku w płynach ustrojowych człowieka. Metody te powinny charakteryzować się m.in. precyzją i dokładnością, a ponadto ich parametry walidacyjne powinny spełniać wymogi stawiane tego typu metodom przez właściwe instytucje, jak np. Amerykańska Agencja Żywności i Leków. I właśnie opracowania takich metod dla wybranych cytostatyków (doksorubicyna, epirubicyna, idarubicyna i docetaksel) podjęła się Doktorantka. Wybrana tematyka badawcza jest ważna i odpowiada aktualnym potrzebom nowoczesnej terapii onkologicznej, a opracowane metody mogą być w przyszłości wykorzystane w praktyce klinicznej.

Oceniana rozprawa została przygotowana na podstawie pięciu spójnych tematycznie publikacji anglojęzycznych, których sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania (z ang. *impact factor*) wynosi 20,469, a suma punktów MEiN 365. Mgr Olga Maliszewska jest pierwszym autorem w czterech pracach, a w jednej drugim. Główne elementy obejmującej 72 strony rozprawy to wstęp,

cel pracy, omówienie wspomnianych 5 publikacji oraz podsumowanie. Ponadto, na początku znajdują się spis treści, wykaz skrótów oraz spis publikacji i doniesień zjazdowych Doktorantki; a na końcu streszczenia po polsku i angielsku oraz bibliografia. Spis literatury obejmuje 123 pozycji piśmiennictwa, z czego ponad 50% prac zostało opublikowanych w ostatnim dziesięcioleciu, a prawie 80% w ostatnim dwudziestolecu. Do rozprawy dołączone są również opublikowane prace wraz z materiałami dodatkowymi.

We wstępie Doktorantka podaje informacje epidemiologiczne odnośnie liczby zachorowań i zgonów osób dorosłych z powodu chorób nowotworowych w Polsce i na świecie, wraz z wyszczególnieniem najczęściej występujących rodzajów nowotworów. Ponadto przedstawia analogiczne dane dotyczące chorób nowotworowych u dzieci w Polsce. Zwraca również uwagę na ciągle rosnącą liczbę zachorowań w obu grupach wiekowych, wskazując, że jest to ogromny problem zdrowotny oraz społeczno-ekonomiczny. W związku z tym, iż opracowane w ramach realizacji badań metody zostały zaaplikowane do pomiaru stężenia leków cytostatycznych u dzieci leczonych onkologicznie z powodu Chłoniaka Hodgkina, mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego lub naczyńniakomięsaka serca, choroby te są scharakteryzowane bardziej szczegółowo. We wstępie mgr Olga Maliszewska opisuje ponadto przebieg procesu kancerogenezy, wskazując, że u jego podstaw leży mutacja DNA komórki. Dalsze podrozdziały poświęcone są terapii onkologicznej oraz charakterystyce leków przeciwnowotworowych, a dokładnie antracyklin i taksanów, które były oznaczane w ramach prowadzonych badań. W następnej części wstępu omówiona jest terapia monitorowana stężeniem leku. Autorka wskazuje potrzeby wprowadzania tego typu terapii oraz wymienia konkretne rodzaje leków i schorzeń, w przypadku których jest ona stosowana. Podkreśla również, że do stosowania tego typu terapii niezbędne są wiarygodne metody analityczne, a do takich zaliczana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Wybór tej metody podyktowany jest również tym, iż jest ona często wykorzystywana w laboratoriach farmaceutycznych i klinicznych, co jest kluczowe z punktu widzenia użyteczności klinicznej opracowanych metod analitycznych. I właśnie metodzie HPLC poświęcony jest ostatni podrozdział wstępu. Są w nim m.in. zebrane podstawowe informacje nt. chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz oraz rodzajów detektorów stosowanych w połączeniu z techniką HPLC. Polska nazwa wspomnianej w tej części rozprawy metody jonizacji ESI (z ang. *electrospray ionisation*) to elektrorozpylanie, a nie elektrorozpraszanie. Ponadto przedstawione są aspekty, na jakie należy zwrócić uwagę podczas optymalizacji metody analitycznej, począwszy od przygotowania próbki po parametry rozdzielania chromatograficznego i dobór optymalnego detektora. Autorka podkreśla również, że metoda analityczna powinna zostać zwalidowana i wymienia jakie parametry walidacyjne należy wyznaczyć doświadczalnie. Informacje

zawarte we wstępie przedstawione są w przystępny sposób, a dobór omówionych zagadnień jest adekwatny do tematyki rozprawy.

W rozdziale drugim przedstawiony jest jasny i zrozumiały cel pracy, którego realizacja została podzielona na dwa etapy. Pierwszy poświęcony jest metodom oznaczania leków z grupy antracyklin, a drugi oznaczaniu docetakselu z grupy taksanów. Dla każdego etapu wypunktowane zostały zadania badawcze, które prowadzą do ich realizacji, a w konsekwencji do realizacji celu pracy.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy omówione są w rozdziale trzecim. Na początku rozdziału przedstawiona jest pokrótce tematyka każdej z prac wraz z uzasadnieniem wybranej metody oznaczania. Podana jest również informacja, że oznaczenia stężeń cytostatyków w próbkach klinicznych zostały wykonane za zgodą Niezależnej Komisji Biotycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym. Następnie omówione są poszczególne prace, każda w takim samym schemacie: Wprowadzenie, Część doświadczalna i wyniki badań oraz Wnioski.

Publikacje nr 1-3 dotyczą oznaczania antracyklin, odpowiednio dokсорubicyny, epirubicyny i idarubicyny, w próbkach osocza i moczu. W każdej z prac oznaczenia przeprowadzono metodą chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (LC-FL). Optymalizacja metodyki obejmowała dobór odpowiedniej kolumny chromatograficznej i warunków rozdzielania oraz optymalnej metody ekstrakcji. Następnie opracowana metodyka była walidowana i aplikowana do pomiaru stężeń poszczególnych leków w próbkach klinicznych. Dla każdego z leków i rodzajów próbek (mocz i osocze) najbardziej efektywna okazała się ekstrakcja na fazie stałej (SPE). Dzięki wykorzystaniu tej metody możliwe było opracowanie protokołu ekstrakcji, który pozwala na użycie mniejszej objętości badanego materiału niż wymagają tego protokoły opisane w literaturze. Ponadto, w porównaniu do wcześniej opisanych metod, zaletą opracowanych metod jest krótszy czas rozdzielania, a uzyskane parametry walidacyjne są niższe lub porównywalne do tych charakteryzujących wcześniej opublikowane metody chromatograficzne. Analiza próbek klinicznych pokazała, że stężenie antracyklin w moczu jest znacząco wyższe niż w osoczu.

Publikacja nr 5 przedstawia metodykę oznaczania leku z grupy taksanów (docetakselu), również w próbkach osocza i moczu. Ponownie testowano różne kolumny chromatograficzne i warunki rozdzielania, a do przygotowania próbek zastosowano metodę dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz wspomaganą ultradźwiękami, której warunki również optymalizowano. W przeciwieństwie do wcześniejszych prac do detekcji docetakselu wykorzystano spektrometrię mas. Parametry walidacyjne metody nie przekraczały maksymalnych dopuszczalnych wartości. Analiza próbek klinicznych pokazała, że odwrotnie niż w przypadku antracyklin, stężenie docetakselu było wyższe w próbkach osocza niż moczu.

Badania przedstawione w publikacji nr 4 miały na celu opracowanie metodyki ekstrakcji doksorubicyny z tkanek zwierzęcych (wątroba, nerki, żołądek, płuca, serce, śledziona). Oznaczenia leku wykonywano zaadoptowaną metodą LC-FL opisaną w Publikacji nr 1. Spośród zastosowanych metod ekstrakcji (deproteinizacja, ekstrakcja ciecz-ciecz, SPE) najlepsze wyniki uzyskano stosując metodę SPE.

Badania będące przedmiotem każdej z pięciu prac zostały bardzo dobrze zaplanowane i są kompletne. Ich przeprowadzenie wymagało m.in. wiedzy i umiejętności z zakresu opracowywania i walidacji metod analitycznych opartych na chromatografii cieczowej oraz przygotowywania próbek biologicznych. W czterech z pięciu publikacji przedstawiony jest wkład poszczególnych autorów w powstanie pracy, z którego wynika, że Pani mgr Olga Maliszewska miała duży udział w powstaniu tych publikacji uczestnicząc m.in. w planowaniu i wykonywaniu badań czy też opracowaniu danych i przygotowaniu manuskryptów. W Publikacji nr 1 nie są zamieszczone takie informacje, ale fakt, że Doktorantka jest pierwszą autorką tej pracy, wskazuje na Jej znaczący udział. Drobne uwagi/pytania jakie mam do tych prac są następujące:

- 1) W czterech publikacjach (Publikacja nr 1 - str. 378, nr 3 - str. 10, nr 4 - str. 4 i nr 5 - str. 4) w opisie metod prędkość wirowania podana jest w postaci liczby obrotów na minutę (rpm). Aby procedura była łatwo odtwarzalna dla innych badaczy, prędkość wirowania powinna być wyrażona w wartościach względnej siły odśrodkowej g .
- 2) Czy wartości stężeń doksorubicyny zmierzone u pacjenta po dożylnym podaniu leku (Publikacja nr 1, Rycina 4) przedstawione są w postaci średniej i odchylenia standardowego? Czy wartości te zostały uzyskane z dwóch pomiarów, każdy dla jednego z wlewów dożylnych? Powinno to być doprecyzowane w legendzie do ryciny. Analogicznie, czy wartości stężeń epirubicyny i docetakselu zmierzone u pacjentów po dożylnym podaniu leków (epirubicyna - Publikacja nr 2, Ryciny 4 i 5; docetaksel – Publikacja nr 5, Ryciny 2 i 3) to wartości uzyskane dla jednego pomiaru? Rozumiem, że w trosce o dobro pacjenta powinno się pobrać minimalną ilość materiału do badań, ale czy objętość przygotowanej próbki nie pozwalała na wykonanie więcej niż jednego pomiaru?

Podsumowując, uważam, iż rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Maliszewskiej dostarcza nowych rozwiązań analitycznych, które mogą być ważnym elementem terapii monitorowanej stężeniem leku u pacjentów onkologicznych. Istotne jest również to, że opracowane metody mogą być stosowane do oznaczania leków u pacjentów pediatrycznych. Oceniana rozprawa jest bardzo dobrze napisana pod względem merytorycznym, jednak z poziomu recenzenta muszę wspomnieć o zauważonych „literówkach” i błędach edytorskich, jak np. zdanie na stronie 28 rozprawy, w którym powinno być: „...metody LC-FL oferują odpowiednią dokładność, precyzję i czułość analiz...”. Pragnę

jednak podkreślić, że zarówno wymienione w recenzji uwagi, jak i błędy edytorskie nie podważają wartości merytorycznej i potencjału aplikacyjnego przeprowadzonych badań.

Biorąc pod uwagę całość rozprawy doktorskiej stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Olgi Maliszewskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742), w związku z czym zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Olgi Maliszewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora. Ponadto, ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz potencjał aplikacyjny opracowanych metod zwracam się z prośbą do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.

Białystok, dn. 27.08.2023r.

KIEROWNIK
Laboratorium Metabolomiki
Centrum Badań Klinicznych
Ciborowski
prof. dr hab. Michał Ciborowski

